INTRODUÇÃO A MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Carol H. Collins - Gilberto L. Braga - Pierina S. Bonato
(coordenadores)

EDITORA DA UNICAMP

7ª EDIÇÃO

Este livro é uma introdução descritiva de vários métodos cromatográficos que estão sendo usados tanto em pesquisas universitárias quanto em análises de rotina em laboratórios industriais. Ele reúne os princípios básicos da cromatografia com descrições de suas diferentes modalidades, seus equipamentos e aplicações.
O livro preenche lacuna resultante da falta de uma obra em língua portuguesa que aborde de forma didática e completa as várias técnicas cromatográficas. Ele tanto serve como livro-texto para alunos de graduação e de pós-graduação quanto como um manual para usuários de cromatografia, apresentando, além dos conceitos básicos, várias referências que podem complementar o interesse de pessoas que atuam no campo cromatográfico. O livro também traz uma série de experiências simples e relativamente fáceis que podem auxiliar no ensino da técnica.
Assim, esta obra, ao lado de ser uma peça importante para os pesquisadores químicos, é também de grande valia para pesquisadores de outras áreas, como biologia, ciências farmacêuticas, engenharia de alimentos e geologia, que possuam problemas de separação química e recorram à cromatografia como ferramenta auxiliar de trabalho.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP**

In8 7.ed.	Introdução a métodos cromatográficos / coord. Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. -- 7.ed. -- Campinas, SP : Editora da UNICAMP, 1997. (Série Manuais) 1. Cromatografia – Química analítica. I. Collins, Carol H. II. Braga, Gilberto L. III. Bonato, Pierina S. IV. Título.
ISBN 85-268-0164-3	20. CDD - 543.089

Índice para Catálogo Sistemático:

1. Cromatografia: Química analítica 543.089

Série Manuais

Coordenação Editorial
Carmen Silvia P. Teixeira

Produção Editorial
Sandra Vieira Alves

Editoração
Nívia Maria Fernandes

Revisão
Adagoberto Ferreira Baptista

Diagramação/Formatação/ Impressão a laser
Projeto A Comunicações Ltda.

Arte-Final
Nelson Norte Pinto

Capa
Vlad Camargo

Editora da Unicamp
Caixa Postal 6074
Cidade Universitária - Barão Geraldo
CEP 13083-970 - Campinas - SP - Brasil
Tel.: (019) 239.8412
Fax: (019) 239.3157

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO

De modo geral, as técnicas cromatográficas são de larga aplicação em química e bioquímica, na pesquisa e na indústria.

Estas técnicas cromatográficas variam desde as de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipuladas por não-peritos, até as de alta sofisticação, usadas só por especialistas. Entre estes dois extremos existem muitas variações de maior ou menor complexidade.

Para cada modalidade de cromatografia estão disponíveis livros especializados, baseados em artigos originais, publicados em inglês ou outra língua estrangeira nas revistas de cromatografia. Porém, são raros os livros em língua portuguesa que contêm as informações básicas, teóricas e práticas sobre estas técnicas de tão largo uso.

Na tentativa de evitar a dependência de livros em língua estrangeira, publicamos, em 1987, a primeira edição deste livro básico sobre técnicas cromatográficas que apresentou informações sobre as várias modalidades de cromatografia. O sucesso obtido nos motivou a lançar esta nova edição, exaustivamente revisada e ampliada, tanto no conteúdo dos capítulos já existentes quanto do novo, descrevendo outra modalidade de cromatografia.

Este livro continua sendo destinado ao uso, como texto, em cursos a nível de graduação ou como livro introdutório às técnicas de separação cromatográfica para pós-graduandos. Pode também servir como base para o pesquisador que pretende usar a cromatografia apenas como uma ferramenta em suas experiências, sem necessitar de uma base teórica profunda.

Conseqüentemente, este livro não se destina a especialistas e nem é um compêndio que abrange referências a todos os novos desenvolvimentos no campo. Técnicas cromatográficas estão em contínuo desenvolvimento e rapidamente tornam obsoleto qualquer livro desta categoria. Sendo assim, esta finalidade será melhor atingida pela consulta a livro e outras referências citadas nas listas bibliográficas que acompanham cada capítulo, bem como novos livros ainda não publicados.

A obra consiste de um capítulo descrevendo os princípios básicos de cromatografia, oito capítulos que descrevem as diferentes técnicas cromatográficas e um capítulo que reúne sugestões para experimentos na programação experimental das disciplinas; bem como os apêndices que apresentam os símbolos recomendados para uso em cromatografia na língua portuguesa e outras informações importantes.

Apesar dos capítulos terem autores diferentes, cada um descrevendo a sua especialidade, houve um esforço coletivo na confecção do texto para que os termos e símbolos fossem uniformes. Os termos e símbolos usados são os sugeridos em publicações recentes na revista Química Nova (vol. 11, pp. 443-464 (1988) e vol. 12, pp. 92-94 (1989)), que se baseiam, em sua maioria, nos recomendados pela União Internacional de Química Pura e Aplicada. Entretanto, leitores que procurarem as referências citadas deverão estar alertas para o fato de que os símbolos e termos aqui usados podem estar substituídos por outros, sendo que, recentemente, não existia uniformidade nos símbolos e termos usados nas diferentes modalidades de cromatografia.

As unidades das quantidades físicas e símbolos adotados seguiram as indicações do Sistema Internacional de Unidades (Le Système International d'Unités (SI), 5ª edição, 1985).

Os editores e autores desta obra consideram que nela aplicaram o melhor de seus esforços. No entanto, agradeceriam não só sugestões como indicações para erros e/ou conceitos mal formulados. Além disto, agradecem aos que direta ou indiretamente colaboraram com seu trabalho e entusiasmo para que esta publicação se tornasse viável.

CAPÍTULO I

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA

Carol H. Collins
Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas

1. INTRODUÇÃO

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.

Existem várias formas de se realizar o processo cromatográfico. Detalhes sobre algumas destas formas serão assuntos dos capítulos a seguir, enquanto que neste serão apresentados alguns dos conceitos mais gerais. Antes disto, será relatada uma breve revisão histórica do desenvolvimento das técnicas cromatográficas mais importantes.

2. ASPECTOS HISTÓRICOS DA CROMATOGRAFIA

Os termos "cromatografia", "cromatograma" e "método cromatográfico" são atribuídos ao botânico russo MIKHAEL SEMENOVICH TSWETT, que, em 1906, utilizou estes termos em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, onde usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo. O nome deriva-se das palavras gregas "chrom" (cor) e "graphe" (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados.

Todavia, nesta época os processos, aplicando a migração diferencial, já eram bem conhecidos. Paralelo aos desenvolvimentos de TSWETT, REED, na Inglaterra, e DAY, nos Estados Unidos, aplicaram colunas contendo sólidos para a separação de sais orgânicos e amostras de petróleo, respectivamente. Bem antes destes, RUNGE descreveu os "desenhos" feitos por misturas de sais e por tintas que foram colocadas no centro de um papel de filtro e depois espalhadas pela passagem de um solvente, enquanto

SCHOENBEIN fez experiências similares com tiras de papel mergulhadas em solventes. O uso de sólidos em camada delgada sobre vidro, no lugar de papel, para o desenvolvimento circular de misturas de sais inorgânicos foi experimentado por BEYERINCK em 1889.

Apesar destas experiências, considerou-se que a época moderna de cromatografia começou na década de 30, quando KUHN e LEDERER "redescobriam" e aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, repetindo as experiências de TSWETT, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, usando uma coluna recheada com carbonato de cálcio pulverizado e éter de petróleo como fase móvel.

Em 1941, MARTIN e SYNGE publicaram um trabalho no qual descreveram a cromatografia por partição (cromatografia líquido-líquido), aplicaram o conceito de altura equivalente a um prato teórico à cromatografia e anteciparam o surgimento de duas cromatografias: a gasosa e a líquida de alta eficiência. Por este trabalho receberam o Prêmio Nobel em 1952. MARTIN também participou em outros desenvolvimentos importantes na história da cromatografia: com CONSDEN e GORDON, reintroduziu a cromatografia em papel; com HOWARD, desenvolveu a cromatografia líquida aplicando as chamadas "fases reversas"; e com JAMES, atualizou a cromatografia gás-líquido.

A cromatografia gás-sólido foi descrita pela primeira vez em 1941, por HESSE e col., que separaram dois ácidos graxos, no vapor a 100°C, arrastando-os sobre sílica com o gás, dióxido de carbono, enquanto CREMER e PRIOR foram os primeiros a descreverem um cromatógrafo a gás completo.

O desenvolvimento, quase simultâneo, do detector por ionização em chama por PRETORIUS e col. e por McWILLIAMS e DEWAR, ampliou a sensibilidade do método cromatográfico, enquanto que a introdução de colunas capilares por GOLAY ampliou os seus poderes analíticos, ao ponto de tornar a cromatografia gasosa o método analítico de separação e determinação mais usado no mundo.

A cromatografia em camada delgada foi reintroduzida em 1938, por IZMAILOV e SCHRAIBER, para a análise de produtos farmacêuticos, mas não foi muito usada até o desenvolvimento, por KIRCHNER e col., do método de aderir o sólido ao suporte e, por STAHL, do método de preparar as placas com reprodutibilidade.

A cromatografia por troca iônica também teve seu início, na época moderna, nos anos 30, com a síntese, por ADAMS e HOLMES, das primeiras resinas de troca iônica, baseadas em fenol e formaldeído, que permitem a troca de cátions. Posteriormente, resinas de poliacrílico ou poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno, com substituintes sulfônicos, carboxílicos ou alquilaminos, substituíram as originais.

As resinas de poliestireno-divinilbenzeno são as mais aplicadas em bioquímica, tendo início com as experiências de COHN na separação de aminoácidos originados de ácidos nucléicos. A separação de aminoácidos foi aperfeiçoada por MOORE e STEIN e, posteriormente, mecanizada por eles, usando uma bomba peristáltica para empurrar a fase móvel e um fotômetro para a detecção, após uma reação para produzir os derivados com ninhidrina. Em 1959, este sistema para a análise de aminoácidos foi modificado por HAMILTON e ANDREWS, com a introdução de uma bomba tipo pistão, similar as usadas ainda hoje em cromatografia líquida de alta eficiência.

Outros desenvolvimentos na década de 60, por KARR e col., JENTOFT e GOUW, HUBER e HULSMAN, SNYDER, KIRKLAND e outros, aperfeiçoaram os sistemas de bombeamento e detecção de cromatografia líquida de alta eficiência, comprovando que o uso destes equipamentos, operado com fase móvel líquida sob pressão e com métodos de detecção sensíveis, possibilita análises de rapidez comparável às de cromatografia gasosa, com resultados altamente satisfatórios.

Paralelamente, os enchimentos para a cromatografia líquida de alta eficiência foram sendo desenvolvidos, inicialmente os peliculares (partículas superficialmente porosas) por HALASZ e por HORVATH, e posteriormente as partículas completamente porosas de diâmetro pequeno (10 μ m, 5 μ m e 3 μ m) por KIRKLAND e outros. O desenvolvimento, por NICKLESS e col., de fases estacionárias

contendo grupos alquilas quimicamente ligados ao suporte permitiu a aplicação da chamada "fase reversa" (fase estacionária apolar), ampliando as aplicações desta técnica; enquanto a introdução de colunas de diâmetro interno menores (as "microbores" e as "capilares recheadas") por SCOTT e por NOVOTNY viabilizaram o uso de cromatografia líquida de alta eficiência para qualquer tipo de análise, quer orgânica quer inorgânica.

Outra técnica cromatográfica que deve seu crescimento ao desenvolvimento das fases estacionárias com grupos alquilas quimicamente ligadas é a cromatografia usando um fluido supercrítico como fase móvel. Esta técnica, que foi aplicada com sucesso por KLESPER e col., em 1962, quando se usou um cromatógrafo a gás modificado, recebeu várias outras alterações por GOUW e JENTOFT no decorrer dos anos seguintes. Somente em 1983 é que foi lançado o primeiro aparelho comercial dedicado a esta técnica.

Além do fato de que vários zeolitas e amidos naturais e modificados já tenham sido testados para a separação de compostos neutros de tamanho grande, foi o desenvolvimento de um gel de dextrano entrecruzado que possui propriedades de uma peneira quase perfeita, por PORATH e FLODIN, que iniciou a cromatografia por exclusão para separações de moléculas de interesse biológico em soluções aquosas.

Separações por tamanho de polímeros, requisitando o uso de solventes orgânicos, foram realizadas por MOORE, usando poliestirenos com grau variável de entrecruzamento.

As primeiras experiências em cromatografia por bioafinidade foram feitas por LERMAN e col. em 1951. Eles isolaram anticorpos usando uma coluna recheada com celulose contendo os antígenos apropriados. Aperfeiçoada por ANFINSEN e col., com o uso de gels de dextrano contendo grupos específicos quimicamente ligados, esta técnica tem grande aplicação na separação e purificação de proteínas e ácidos nucléicos, pois permite a imobilização de somente as espécies complementares aos grupos ligados, e a sua posterior eluição com nova fase móvel.

Várias outras revisões históricas, mais extensas e/ou mais específicas, se encontram na leitura de cromatografia. O leitor interessado pode consultar, dentre estas, a publicada por MORHY.

3. AS CLASSIFICAÇÕES DA CROMATOGRAFIA

São vários os critérios usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo os mais comuns relacionados à técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas.

A forma física do sistema de cromatografia define a técnica geral: a fase estacionária pode ser colocada em um tubo cilíndrico ou disposta sobre uma superfície planar. Baseando-se nesta, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. Na primeira, de acordo com o tamanho do diâmetro interno do tubo, temos as colunas preparativas (6-50 mm), analíticas (2-6 mm) e com microdiâmetro (<2 mm). As colunas preparativas e analíticas sempre apresentam a fase estacionária na forma de partículas e a fase ativa na forma de um sólido ou de um líquido que tanto pode recobrir a superfície do sólido como estar quimicamente ligado a ele. As colunas com microdiâmetro também podem ser recheadas com a fase estacionária ou podem possuir a fase estacionária sob a forma de um filme ou de partículas aderidas nas paredes do tubo.

Considerando o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás, a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido, e a cromatografia supercrítica, onde se usa como fase móvel um vapor pressurizado, em temperatura acima de sua temperatura crítica, com as vantagens de ter viscosidade menor do líquido, mas mantendo as propriedades de interação com os solutos.

A cromatografia líquida em coluna também se divide em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel devido à força da gravidade (por isto, às vezes esta técnica é chamada "cromatografia líquida por força da gravidade"); e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que usa colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão (e, por isto, é, às vezes, chamada "cromatografia líquida de alta pressão") que pode empurrar a fase móvel com vazão mais rápida (resultando em outro nome: "cromatografia líquida de alta velocidade"). Sugere-se, como nome preferido desta técnica, cromatografia líquida de alta eficiência, devido a sua característica mais importante, que é a elevada eficiência atingida na separação.

O estado físico da fase estacionária pode ser líquido ou sólido. O líquido pode estar simplesmente espalhado sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre este. A imobilização pode envolver ligações químicas entre o líquido e o suporte ou somente entre as cadeias do próprio líquido. Devido as vantagens de volatilidade e solubilidade reduzidas atribuídas às fases estacionárias contendo a parte ativa na separação quimicamente imobilizada sobre o suporte, é comum considerar-se esta uma categoria distinta, ou seja, a cromatografia com fase ligada. Justifica-se esta distinção pelo fato de que seu mecanismo de separação freqüentemente difere dos mecanismos atribuídos às fases estacionárias líquidas ou sólidas.

A *Figura I-1* mostra as classificações da cromatografia, segundo as formas físicas mais encontradas.

CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO — CROMATOGRAFIA

TÉCNICA — PLANAR; EM COLUNA

FASE MÓVEL — LÍQUIDO (planar); GÁS; FLUIDO SUPERCRÍTICO; LÍQUIDO (em coluna)

FASE ESTACIONÁRIA — LÍQUIDO, SÓLIDO, FASE LIGADA; LÍQUIDO, SÓLIDO, FASE LIGADA; SÓLIDO, FASE LIGADA; LÍQUIDO, SÓLIDO, FASE LIGADA

TIPO DE CROMATOGRAFIA — CP, CCD, CCD; CGL, CGS, CGFL; CSS, CSFL; CLL, CLS, CE, CLFL, CTI, CB

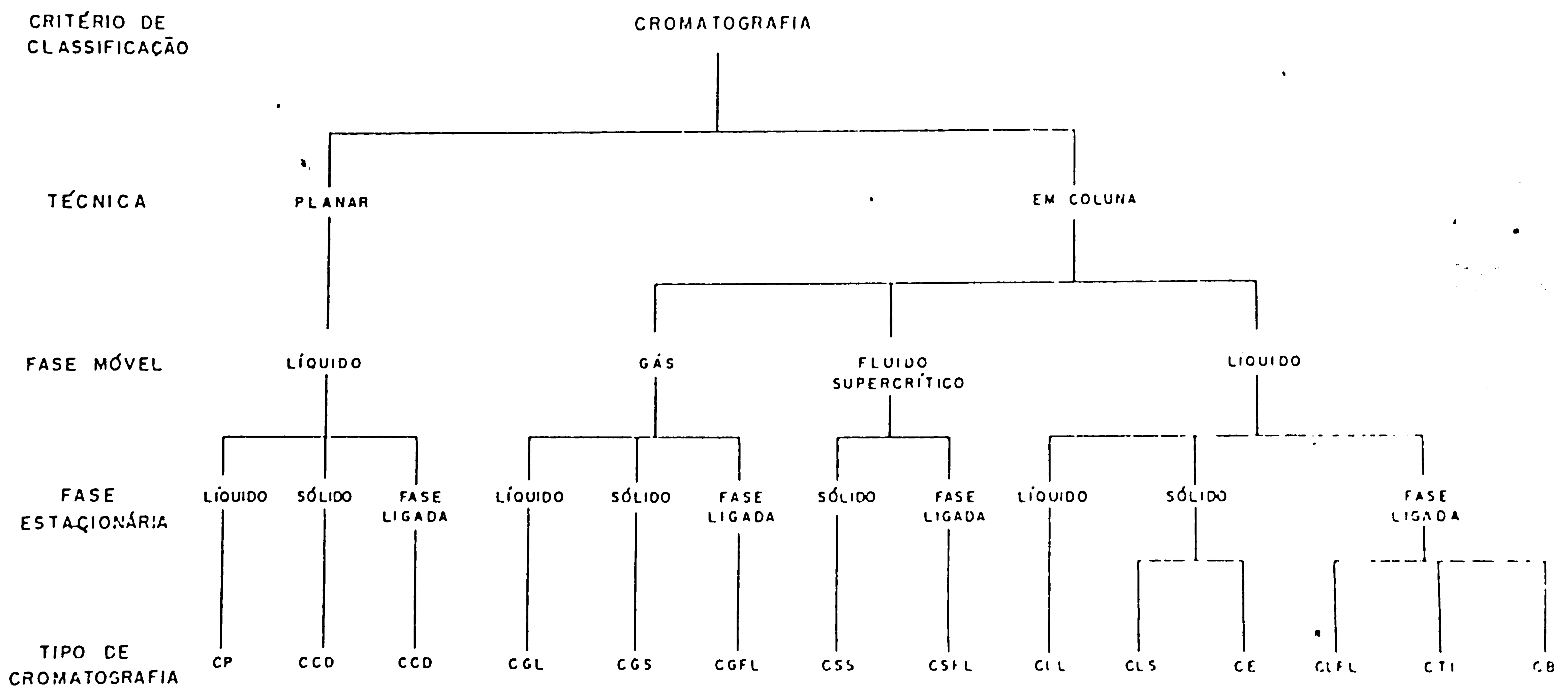



FIGURA I-1 Classificação de cromatografia pelas formas físicas.

Uma outra classificação baseia-se na polaridade relativa das fases. Em cromatografia gasosa, a fase móvel é inerte e a separação ocorre devido as interações das moléculas da amostra com a fase estacionária, enquanto que, na cromatografia líquida, a polaridade de ambas as fases é importante. Chama-se cromatografia líquida com fase normal quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, e cromatografia com fase reversa quando se tem o inverso, ou seja, a fase móvel é mais polar e a fase estacionária mais apolar.

O método de introdução da amostra e seu subseqüente desenvolvimento constitui um outro tipo de classificação (*Figura I-2*). A introdução da amostra em uma única aplicação e seu desenvolvimento com

uma fase móvel pura, que arrasta a amostra ao longo da coluna, é o método da eluição, o tipo mais encontrado em cromatografia analítica. Na cromatografia preparativa, especialmente em nível industrial, freqüentemente usa-se o desenvolvimento por deslocamento, onde os componentes da amostra, uma vez aplicados à coluna, são arrastados ao longo da mesma usando, como fase móvel, um deslocador que é mais atraído pela fase estacionária que qualquer um dos componentes. O cromatograma resultante não mostra picos separados, mas bandas dos componentes separados *(Figura I-2)*. Também se encontra em uso industrial a análise frontal, onde a amostra é continuamente aplicada à coluna, sendo o componente menos retido o único que sai na forma pura *(Figura I-2)*.

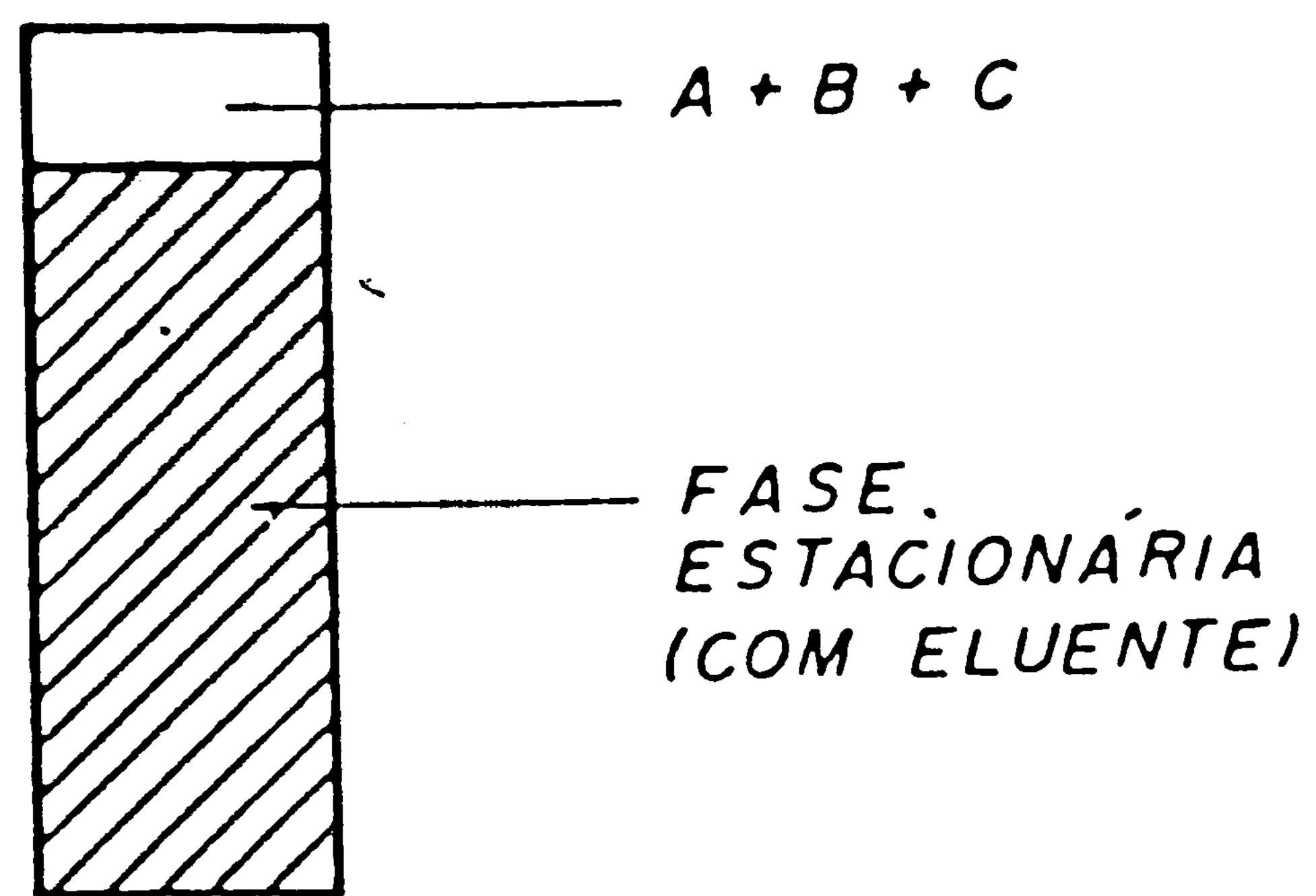
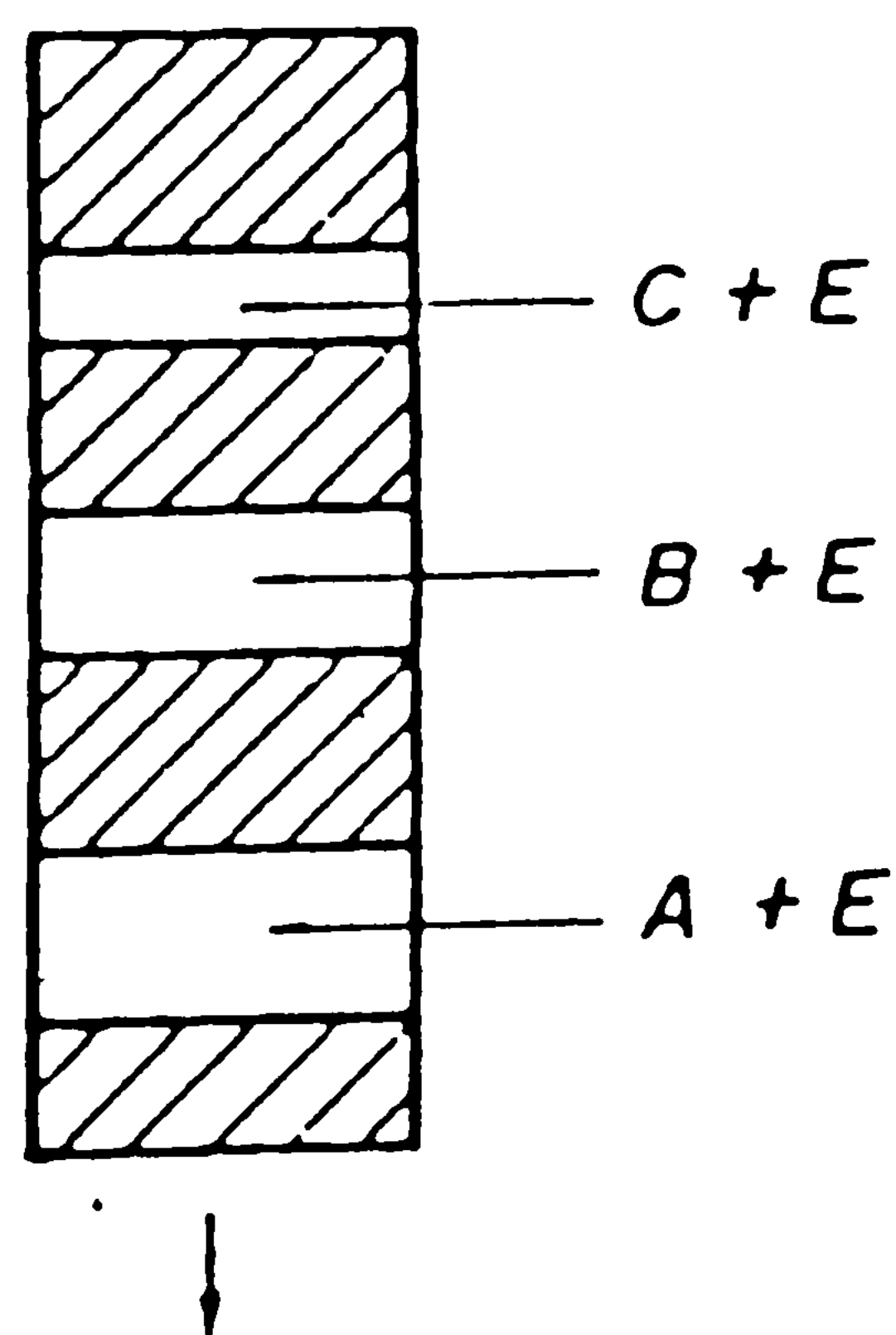
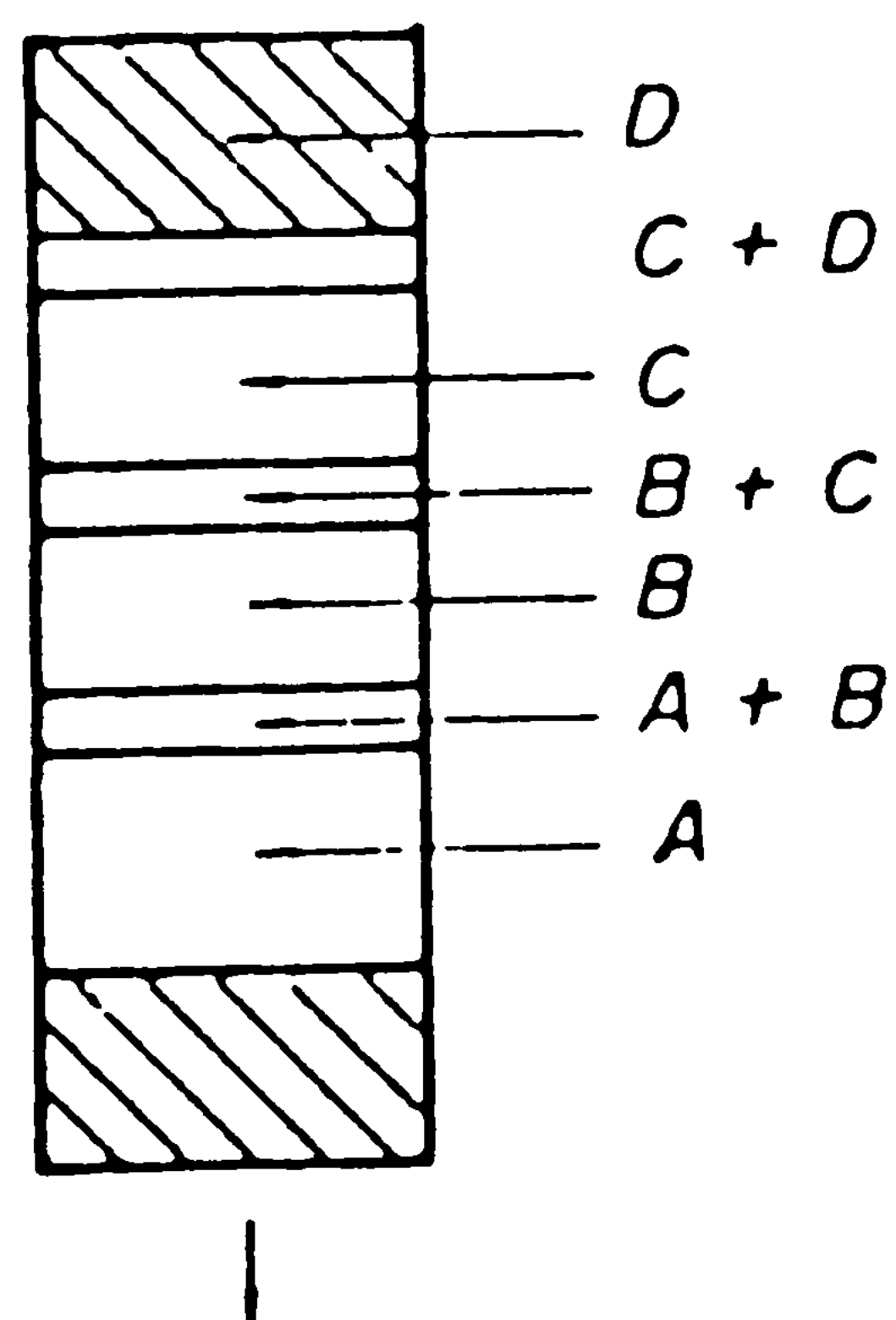
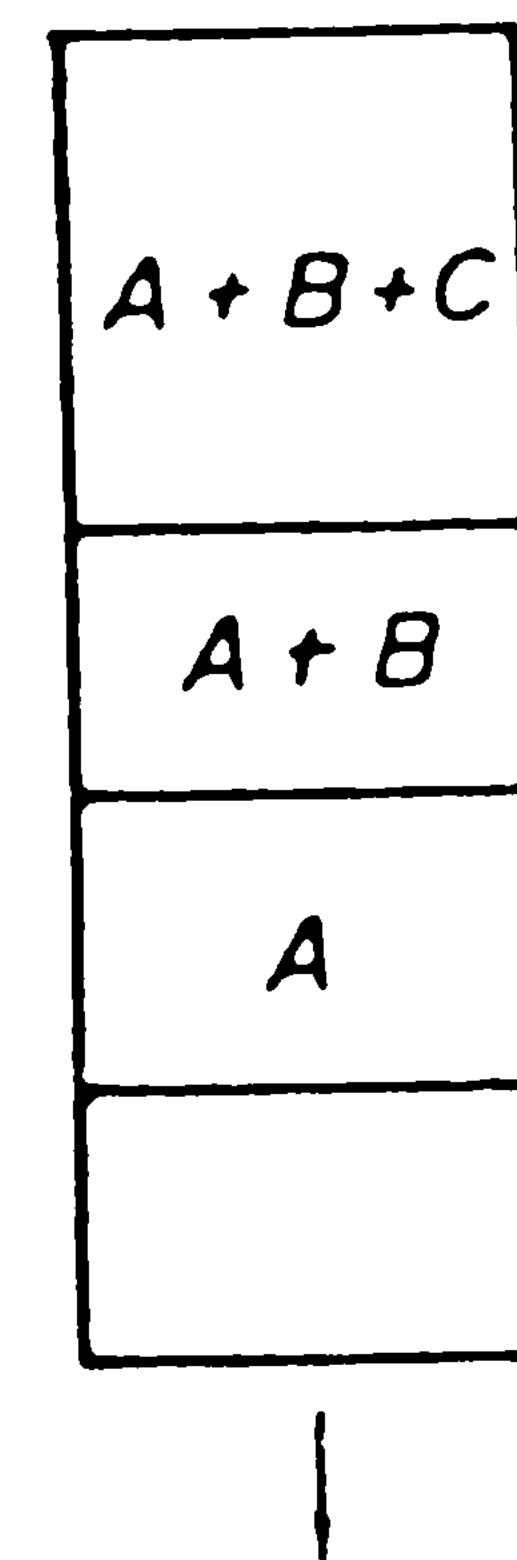
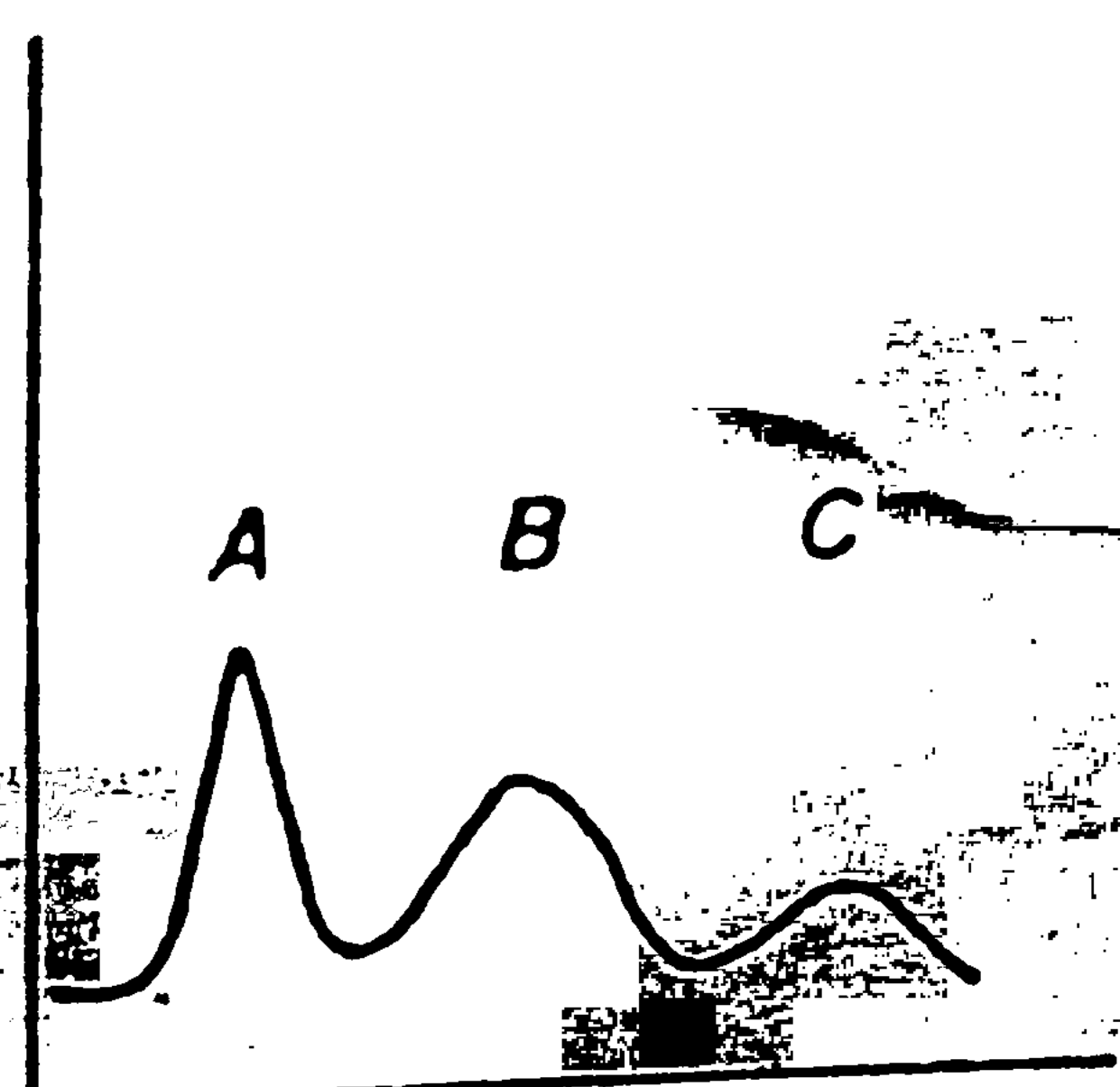
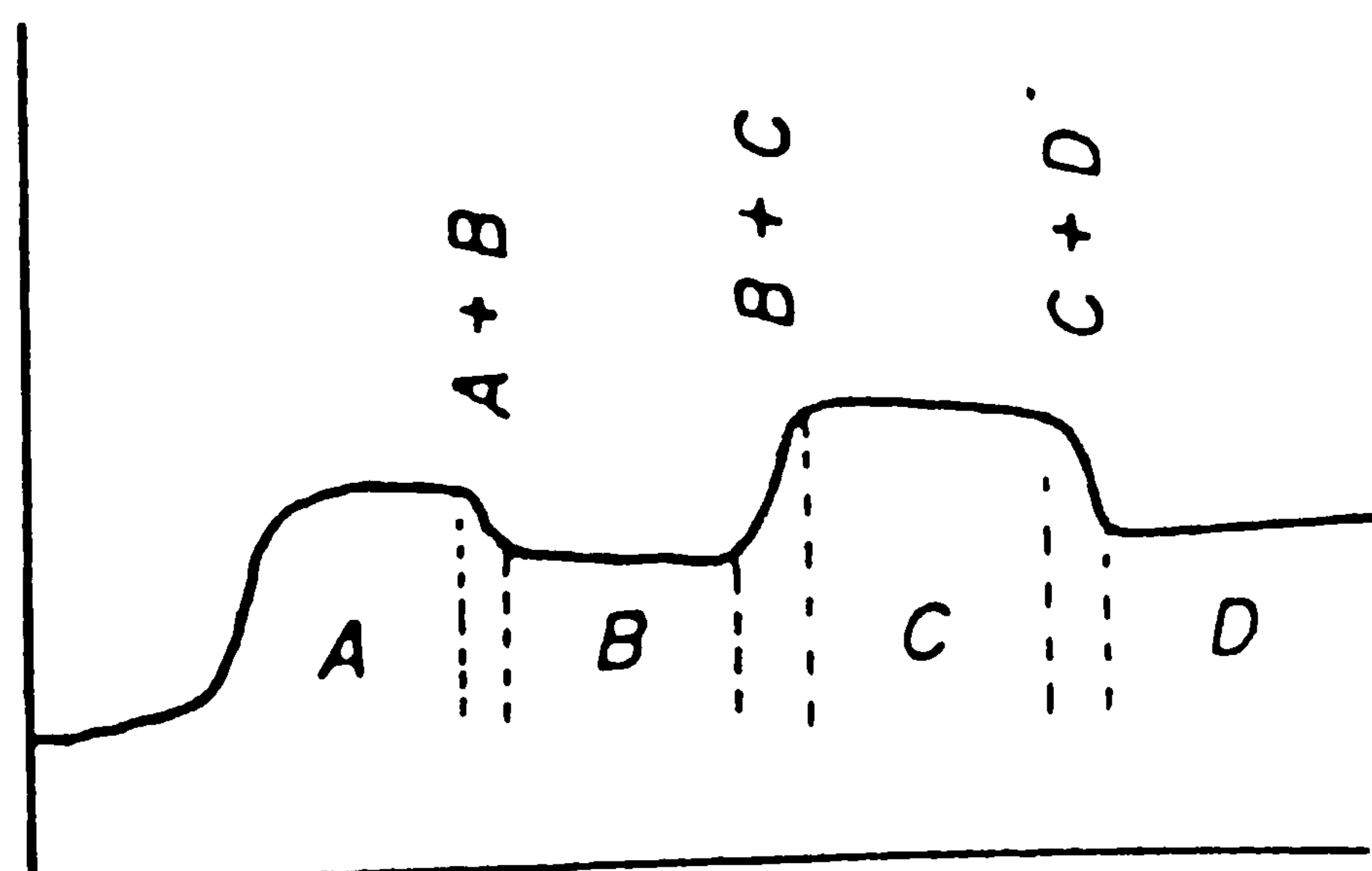
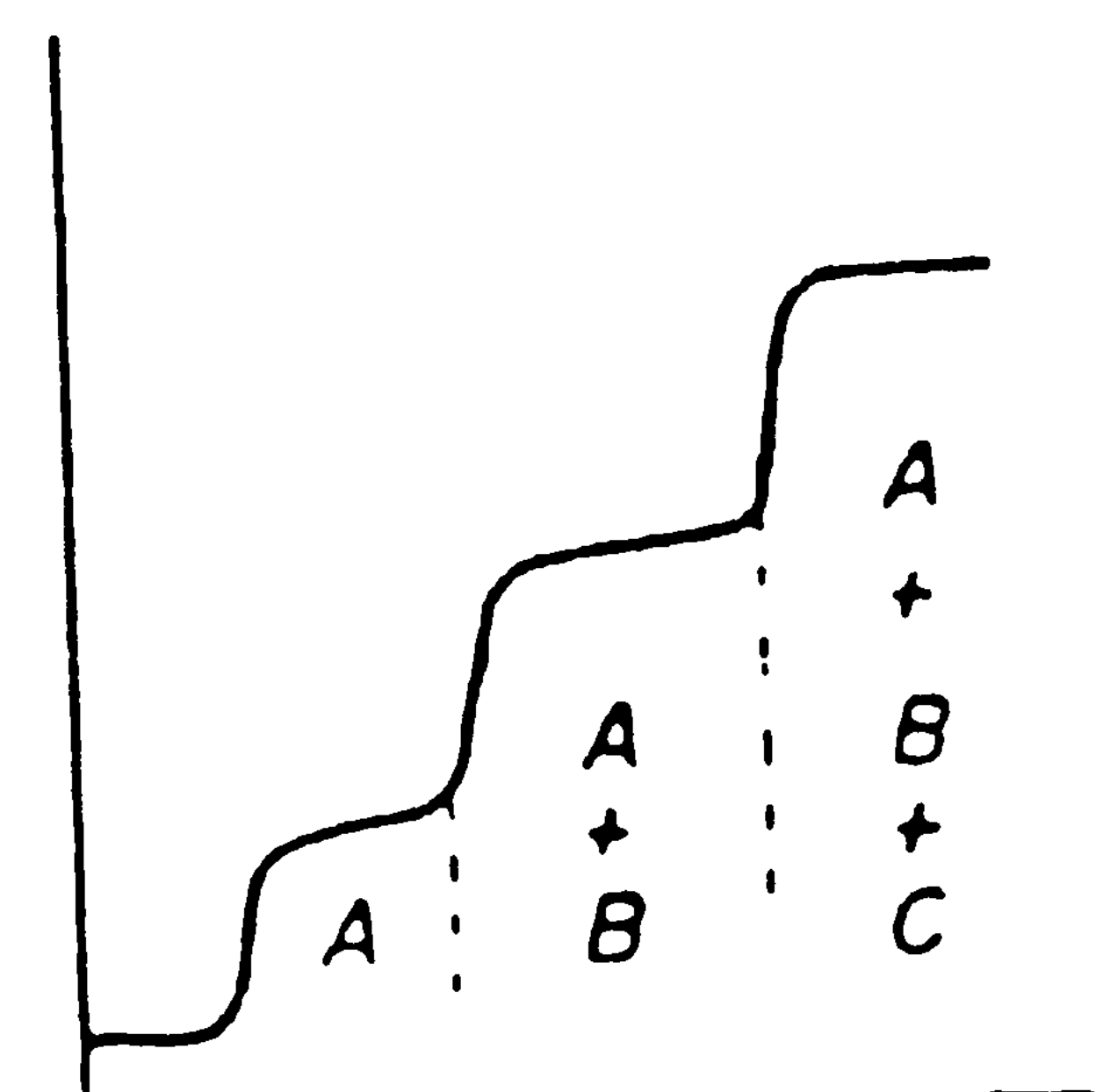



FIGURA I-2 Métodos de desenvolvimento em cromatografia.

Entretanto, considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos.

Os processos físicos são de sorção - adsorção ou absorção (partição) - e são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals), incluindo a formação de pontes de hidrogênio.

Quando se trata de um sólido, como sílica ou alumina, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interface entre o sólido e a fase móvel, devido a presença de grupos ativos nas suas superfícies (*Figura I-3a*). A dessorção do soluto implica na volta deste à fase móvel. Este é o mecanismo mais comumente encontrado em cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatografia gás-sólido (CGS), cromatografia líquido-sólido (CLS) e cromatografia supercrítica com fase estacionária sólida (CSS).

a

b

c

d

e

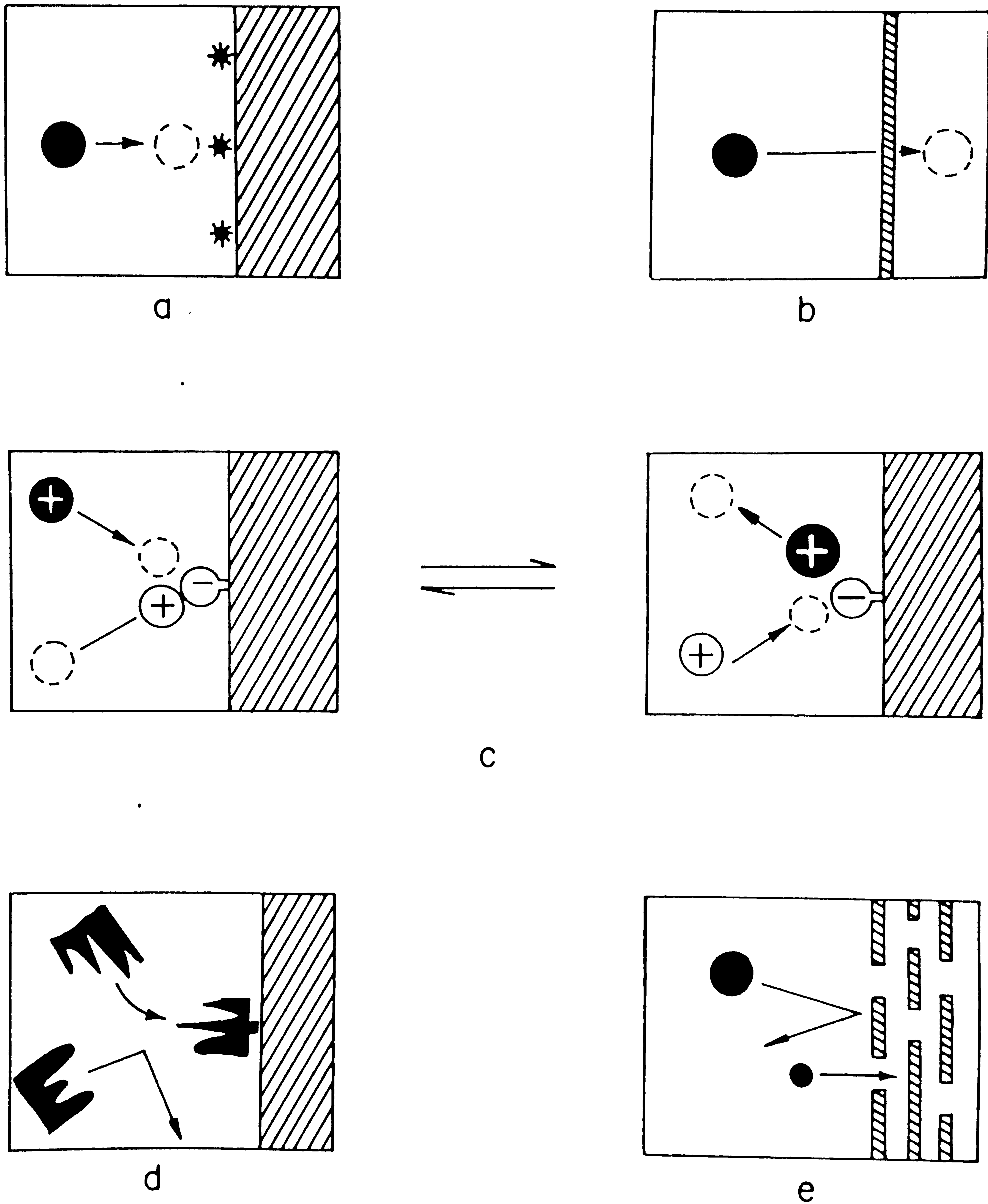



FIGURA I-3 Esquema dos mecanismos cromatográficos de a: adsorção; b: partição; c: troca iônica; d: bioafinidade e e: exclusão.

Quando a fase estacionária é um líquido, espalhado na superfície de um suporte sólido e inerte, ou nas paredes do tubo cromatográfico, o processo é intrafacial; ocorrendo por absorção, ou partição, que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária.(*Figura I-3b*). A volta dos componentes à fase móvel depende de sua volatilidade (fase móvel gasosa) ou de sua solubilidade nesta fase (fase móvel líquida). Encontra-se este mecanismo na cromatografia em papel (CP), na cromatografia gás-líquido (CGL) e na cromatografia líquido-líquido (CLL).

As fases quimicamente ligadas são preparadas reagindo-se alguns grupos hidroxílicos que se encontram na superfície do sólido, normalmente a sílica, com grupos alquilas ou alquilas substituídos. Dependendo do tipo de ligação entre o suporte e a cadeia substituente, estas fases mostram maior estabilidade às temperaturas altas e resistem a dissolução pela fase móvel. Estas fases estacionárias apresentam aos componentes da amostra tanto cadeias longas de alquila, que funcionam como líquido apolar, como regiões da superfície com pontos ativos interfaciais. Sendo assim, o mecanismo de separação destas fases é um compromisso entre partição e adsorção e as suas contribuições dependem da quantidade relativa de cada tipo de grupo funcional. Estas fases estacionárias quimicamente ligadas são as formas mais representativas de cromatografia líquida em coluna (CLFL), sendo também muito usadas na cromatografia que emprega um fluido supercrítico com fase móvel (CSFL). Apesar de terem sido inicialmente desenvolvidas para a cromatografia gasosa (CGFL), o seu uso nesta modalidade é menor, exceto com colunas de dimensões capilares, onde a fase estacionária está freqüentemente imobilizada ou quimicamente ligada à parede do tubo. Fases quimicamente ligadas estão sendo usadas com mais freqüência na cromatografia em camada delgada (CCD), especialmente na técnica chamada cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE).

Para o processo químico de troca iônica, a fase estacionária é constituída de uma matriz onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis. Assim são obtidos os trocadores aniônicos que têm sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, que têm sítios carregados negativamente que retêm cátions.

A fase móvel é, geralmente, uma solução iônica com propriedades tamponantes, escolhidas de forma a ser compatível com o tipo de trocador usado. Desta maneira, se a fase estacionária retém cátions, a fase móvel deve conter cátions capazes de substituí-los preferencialmente. A *Figura I-3c* indica uma representação do mecanismo de cromatografia por troca iônica (CTI) (ver capítulo V).

Outro processo químico encontrado na cromatografia utiliza grupos com especificidade biológica quimicamente ligado às matrizes. Estes grupos, que podem ser, por exemplo, antígenos, enzimas ou lecitinas, retiram da fase móvel somente os componentes complementares, os anticorpos, proteínas ou açúcares, respectivamente, deixando passar todas as outras espécies da amostra, como indica a *Figura I-3d*. Na cromatografia por bioafinidade (CB), a eluição dos componentes retidos pode ocorrer com a mudança das propriedades da fase móvel, por exemplo, a sua acidez, que modifica as propriedades ou do grupo ligado ou do seu complementar, ou por métodos de deslocamento usando outro grupo fortemente atraído (ver capítulo VII).

A cromatografia por exclusão (CE) baseia-se em um processo puramente mecânico. A fase estacionária é uma matriz de composição inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes. As moléculas da amostra são separadas porque as menores são capazes de penetrar facilmente em todos os poros da fase estacionária, equilibrando-se com a fase móvel intrasticial e intersticial, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros, passando entre os grânulos acompanhando a fase móvel intersticial, isto é, a fase móvel que fica fora dos poros (*Figura I-3e*). As moléculas com tamanho efetivo intermediário migram com velocidades variáveis entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada com seu tamanho efetivo (ver capítulo VI).

4. ALGUNS TERMOS TÉCNICOS

A cromatografia tem aplicações qualitativas e quantitativas, obtidas analisando o cromatograma depois de seu desenvolvimento, quer diretamente na superfície planar, quer pelo sinal registrado após o eluato passar por um detector. Os métodos de se obter informações quantitativas são específicos para cada tipo de cromatografia; eles serão expostos nos capítulos seguintes. Aqui serão comentados algumas definições e termos mais gerais, comuns a todos os tipos de cromatografia.

As *Figuras I-4* e *I-5* mostram cromatogramas típicos de cromatografia planar e cromatografia em coluna, respectivamente. Nelas também são indicadas algumas medidas de distância, importantes a cada tipo de cromatografia utilizada.

Na cromatografia planar, a fase móvel, proveniente de um reservatório, passa através dos pontos de partida da amostra e arrasta os componentes da amostra durante o processo de desenvolvimento. Define-se por d_r a distância percorrida pelos componentes e por d_m a distância percorrida pela fase móvel (*Figura I-4*).

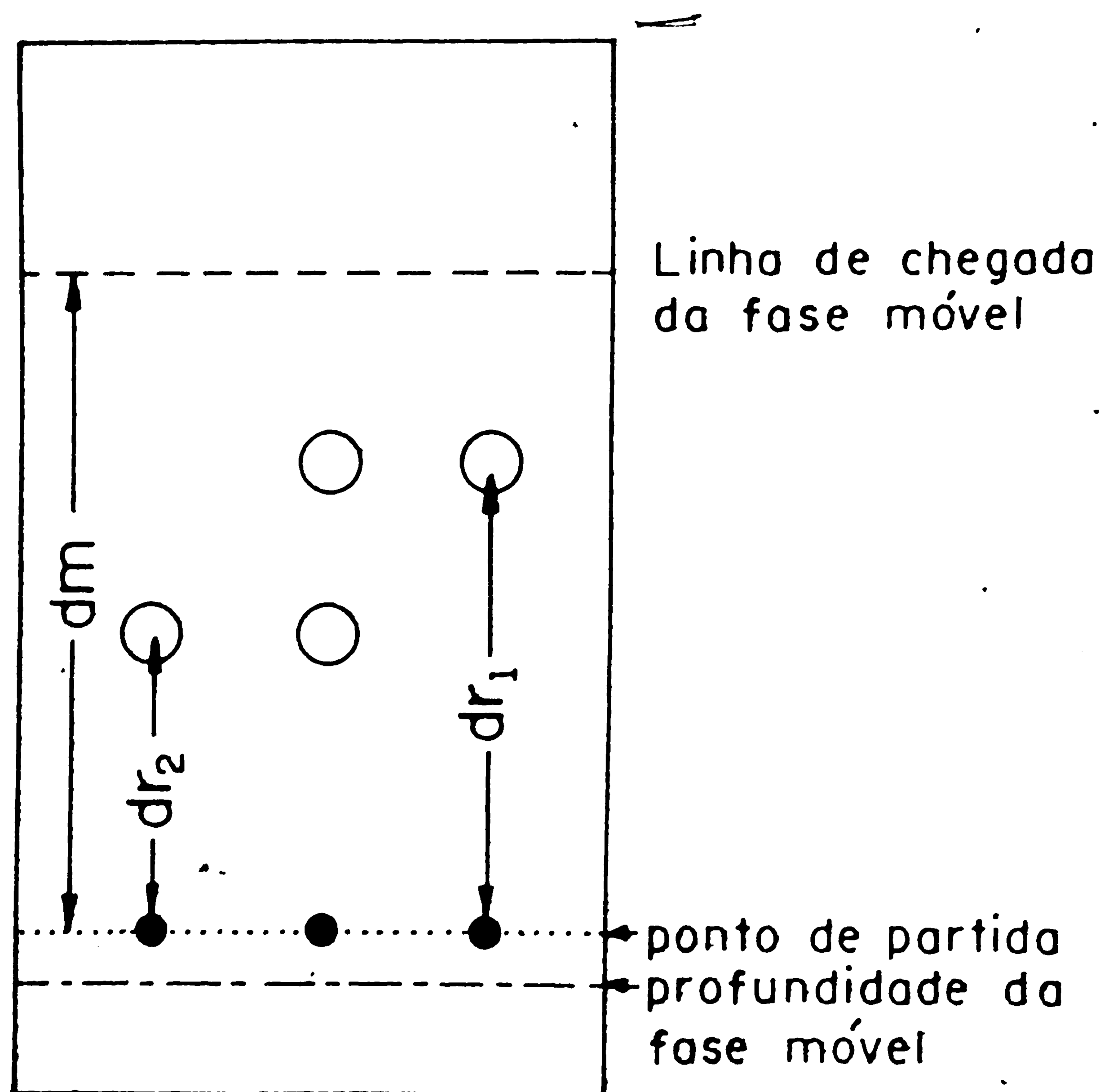



FIGURA I-4 Cromatograma típico desenvolvido por cromatografia planar.

Os mesmos termos se aplicam a um processo cromatográfico realizado em coluna, desde que os componentes permaneçam no tubo cromatográfico sem serem eluídos. Contudo, normalmente a cromatografia em coluna procede com fluxo contínuo da fase móvel, até que todos os componentes tenham saído da coluna e as suas presenças sejam detectadas pelo detector e indicadas graficamente. Alternativamente, o eluato pode ser coletado em frações de volumes idênticos, as suas concentrações medidas e o cromatograma construído, considerando o número do tubo de cada fração equivalente a uma unidade de distância.

Nestes cromatogramas, *Figura I-5*, a linha de base representa a passagem somente da fase móvel através do detector. Quando eluem os componentes são registrados os picos, cujos perfis são proporcionais às concentrações respectivas. Denomina-se d_R a distância percorrida pelo papel desde o instante da injeção da amostra no sistema cromatográfico até o máximo do pico traçado, e d_M a distância desde a injeção até a eluição de um componente que não interage com a fase estacionária. O d_M também representa a distância gasta por uma molécula da fase móvel para ir do ponto de injeção até o detector.

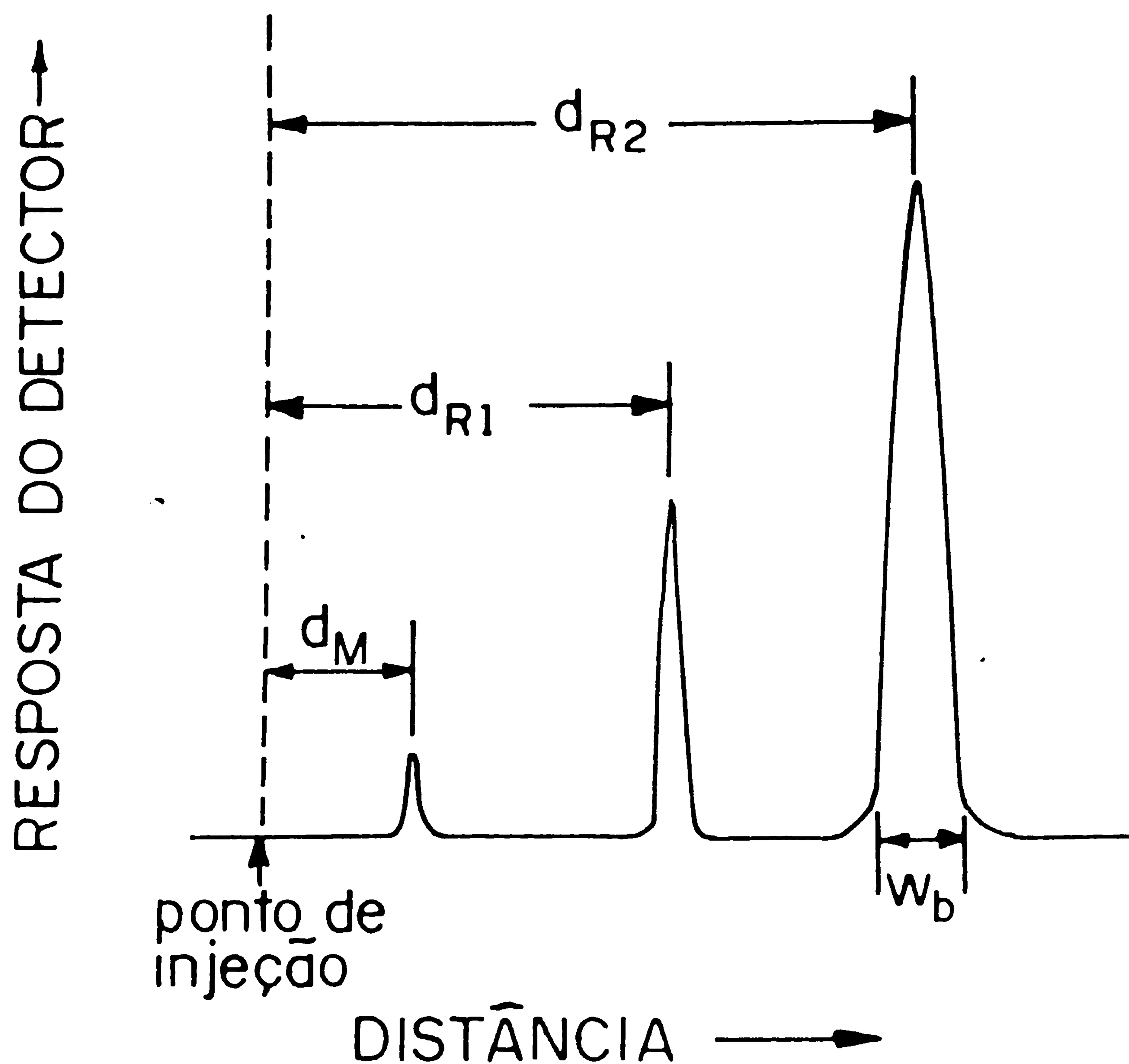



FIGURA I-5 Cromatograma típico obtido por cromatografia em coluna.

Para a cromatografia em coluna é mais comum utilizar ou tempo ou volume, em vez da distância, sendo que esta última é medida no papel, enquanto o tempo ou o volume podem ser diretamente relacionados com o processo ocorrendo na coluna cromatográfica.

Por isto, o tempo de retenção, o tempo gasto desde o ato de injeção até a saída do componente do sistema, t_R, é a variável impressa pelos dispositivos eletrônicos, freqüentemente acoplados a sistemas automatizados de cromatografia. Faltando este dispositivo, o t_R é calculado a partir das medidas feitas no cromatograma:

$$t_R = d_R / f,$$

onde f é a velocidade do papel no registrador gráfico, em unidades de cm/min ou mm/s.

O tempo de retenção engloba todo o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel, quer na estacionária. Quando as moléculas do soluto ficam na fase móvel, elas devem movimentar-se com a mesma velocidade que as moléculas da própria fase móvel. Então, a parte do tempo em que as moléculas do soluto estão na fase móvel é igual ao tempo gasto para as moléculas de fase móvel percorrerem a coluna, t_m :

$$t_M = d_M / f.$$

Sendo assim, a parte do tempo em que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária é calculada pela diferença:

$$t'_R = t_R - t_M .$$

O t'_R, o tempo que o soluto fica retido na fase estacionária, é também chamado de tempo de retenção ajustado.

Similarmente, o volume da fase móvel necessário para eluir um componente, V_R, é calculado a partir do cromatograma:

$$V_R = t_R F = d_R F / f,$$

onde F é a vazão da fase móvel em unidades de mL/min ou mL/s. De maneira similar é calculado o volume requisitado para um componente não retido sair da coluna:

$$V_M = t_M F = d_M F / f.$$

O V_M, também chamado volume morto, representa o volume da fase móvel nos interstícios de uma coluna recheada, ou nos espaços vazios em colunas contendo a fase estacionária somente recobrindo as paredes.

Para evitar possíveis confusões resultantes dos diferentes mecanismos de separação, na cromatografia por exclusão o volume da fase móvel necessário para eluir um componente não retido é chamado V_o; este volume representa a parte intersticial da fase móvel nesta modalidade, isto é, o volume da fase móvel fora dos poros, enquanto o volume total da fase móvel na coluna, V_t, é a soma do volume intersticial, V_o, e o volume intrasticial, V_i:

$$V_t = V_o + V_i .$$

O volume total contido na coluna em cromatografia por exclusão, V_c, inclui também o volume da matriz inerte; V_g:

$$V_c = V_o + V_i + V_g .$$

Nas outras modalidades de cromatografia, o volume total dentro da coluna é:

$$V_c = V_M + V_S ,$$

onde V_S é o volume da fase estacionária.

Estas medidas de distância, tempo e volume são usadas diretamente para fins qualitativos, isto é, para a identificação das substâncias contidas nas amostras, por comparação dos tempos ou volumes de retenção ajustados. Estas medidas são também usadas para calcular os vários valores relacionados à retenção e à eficiência das separações cromatográficas.

O fator de retenção para cromatografia planar é definido:

$$R_f = d_r / d_m .$$

Comparações do valor de R_f da amostra com o de um padrão é o método qualitativo mais usado na cromatografia planar.

Na cromatografia em coluna, a retenção de um componente é determinada pela razão dos tempos que as suas moléculas ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel. Este termo, chamado razão de distribuição das massas, D_m, ou, nos vocabulários velhos, fator de capacidade, k, é definido por:

$$D_m = \frac{t_r - t_M}{t_M} = t'_R / t_M.$$

Ele é relacionado ao coeficiente de distribuição, K_D, pelos volumes das fases:

$$K_D = C_S / C_M = D_m V_M / V_S = D_m \beta ,$$

onde C_S e C_M representam as concentrações do soluto nas fases estacionária e móvel, respectivamente, e β é a razão do volume da fase móvel, V_M, pelo volume da fase estacionária, V_S.

Na cromatografia por exclusão, o fator de capacidade, k', é definido:

$$k' = \frac{V_R - V_o}{V_o} .$$

A diferença entre D_m e k' relaciona-se ao fato que, na cromatografia por exclusão, o volume requisitado pela passagem de uma substância não retida é V_o, o volume da fase móvel intersticial, e não o volume total desta fase.

O coeficiente de distribuição de cromatografia por exclusão, K_o, também utiliza os termos relacionados a esta modalidade:

$$K_o = C_s / C_M = \frac{V_R - V_o}{V_i} .$$

Os termos de retenção são característicos de um componente. Quando são envolvidos mais de um componente na amostra, também calculam-se termos de separação.

O fator de separação, α, é calculado pela razão entre as respectivas razões de distribuição que são, por sua vez, relacionadas aos tempos de retenção ajustados:

$$\alpha = D_{m2} / D_{m1} = t'_{R2} / t'_{R1} .$$

O fator de separação sempre trata com dois picos adjacentes. Um outro termo, a retenção relativa, $r_{L,p}$, envolve a razão de tempos de retenção ajustados do componente e de um padrão, respectivamente. A retenção relativa é usada para identificação de substâncias e pode ser calculada para quaisquer picos no cromatograma, livre da restrição de serem adjacentes.

Uma outra medida quantitativa de separação de dois componentes consecutivos é a resolução, R_s, usada em cromatografia em coluna e calculada a partir da distância que separa as máximas dos picos divididos pela média das larguras de suas respectivas bases, w_b (*Figura I-6*):

$$R_s = \frac{2(d_{R2} - d_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \cong \frac{\Delta d_R}{w_{b2}}$$

Para a largura de base é sempre tomada a distância entre as tangentes traçadas nos lados do pico. Quando os picos são bem adjacentes, a média das suas larguras pode ser substituída pela largura do segundo pico.

A resolução em cromatografia planar é determinada pela separação entre as manchas:

$$R_s \text{ (planar)} = 2(d_{R1} - d_{R2})/(w_{S1} + w_{S2})$$

onde W_S é a largura longitudinal da mancha, enquanto o fator de separação é representado pela razão entre os fatores de retenção:

$$\alpha = R_{f1} / R_{f2} = d_{r1} / d_{r2}$$

A eficiência representada por um cromatograma é medida em termos de número de pratos gerados, teóricos ou efetivos. Um prato teórico pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases, análogo aos pratos teóricos da teoria de destilação. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação.

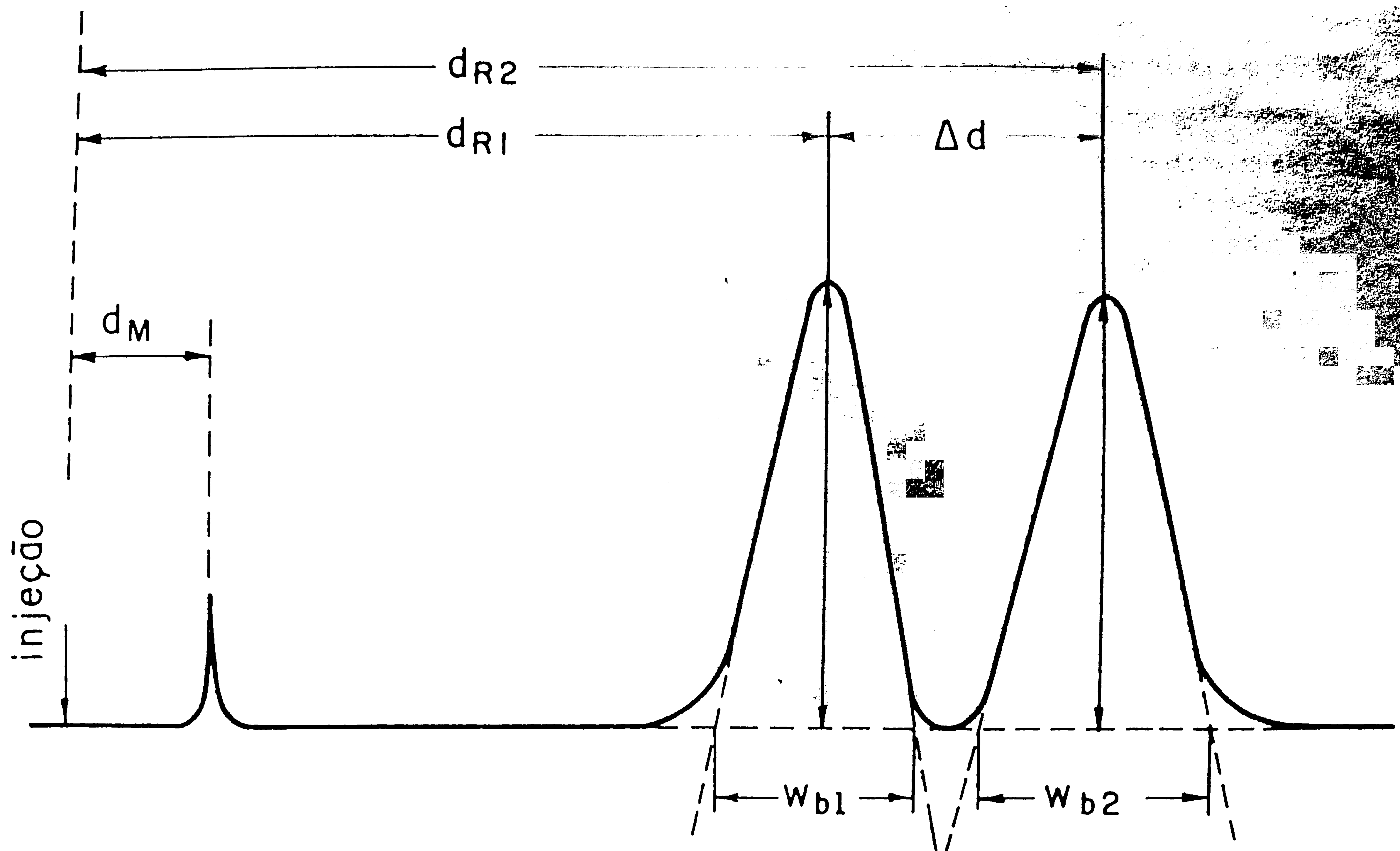



FIGURA I-6 Medidas relacionadas à determinação de resolução.

Na cromatografia planar, o número de pratos teóricos, n_p , é calculado usando as medidas do cromatograma:

$$n_p = 16\, d_r^2 \; / \; w_S^2$$

Portanto, quando as manchas não são bem definidas, a eficiência da corrida é baixa.

Na cromatografia em coluna, o número de pratos teóricos, n_p, é calculado a partir do cromatograma:

$$n = 16\, d_R^2 \; / \; w_b^2 = 5{,}545\, (d_R \; / \; w_h)^2 ,$$

onde w_h é a largura do pico na sua meia altura.

Sendo que a eficiência é melhor relacionada com o tempo que o soluto permanece retido na fase estacionária, e não com o tempo total requisitado pela corrida, o número de pratos efetivos, N, pode ser calculado usando o tempo de retenção ajustado:

$$N = 16\, t'^2_R \; / \; w_b^2 = 5{,}545\, (t'_R \; / w_h)^2$$

Lembre-se que a medida da largura da base, neste caso, deve também ser em unidades de tempo sendo que o número de pratos é um número puro, sem unidades.

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna, fato que torna difícil uma comparação do número de pratos entre diferentes colunas. Por esta razão, a avaliação comparativa entre colunas é feita usando a medida da altura equivalente a um prato, que corresponde à razão entre o comprimento da coluna, L, e o número de pratos.

O valor da altura equivalente a um prato teórico, h, é obtido:

$$h = L / n,$$

enquanto a altura equivalente a um prato efetivo, H, é calculada:

$$H = L / N.$$

Sendo que a finalidade mais importante de qualquer separação cromatográfica é a de resolver os componentes da amostra, devem-se considerar os parâmetros experimentais que influenciam a resolução. A *Figura I-7* mostra três cromatogramas, destacando as contribuições de eficiência e seletividade na resolução. Assim, má eficiência e má seletividade resultam em má resolução, *Figura I-7a*, pois bandas largas e pouco separadas tendem a sobrepor-se. Quando a seletividade é boa, pode-se compensar a má eficiência, *Figura I-7b*, obtendo boa resolução. O ideal é boa resolução conquistada com boa eficiência e boa seletividade, *Figura I-7c*.

a

b

c

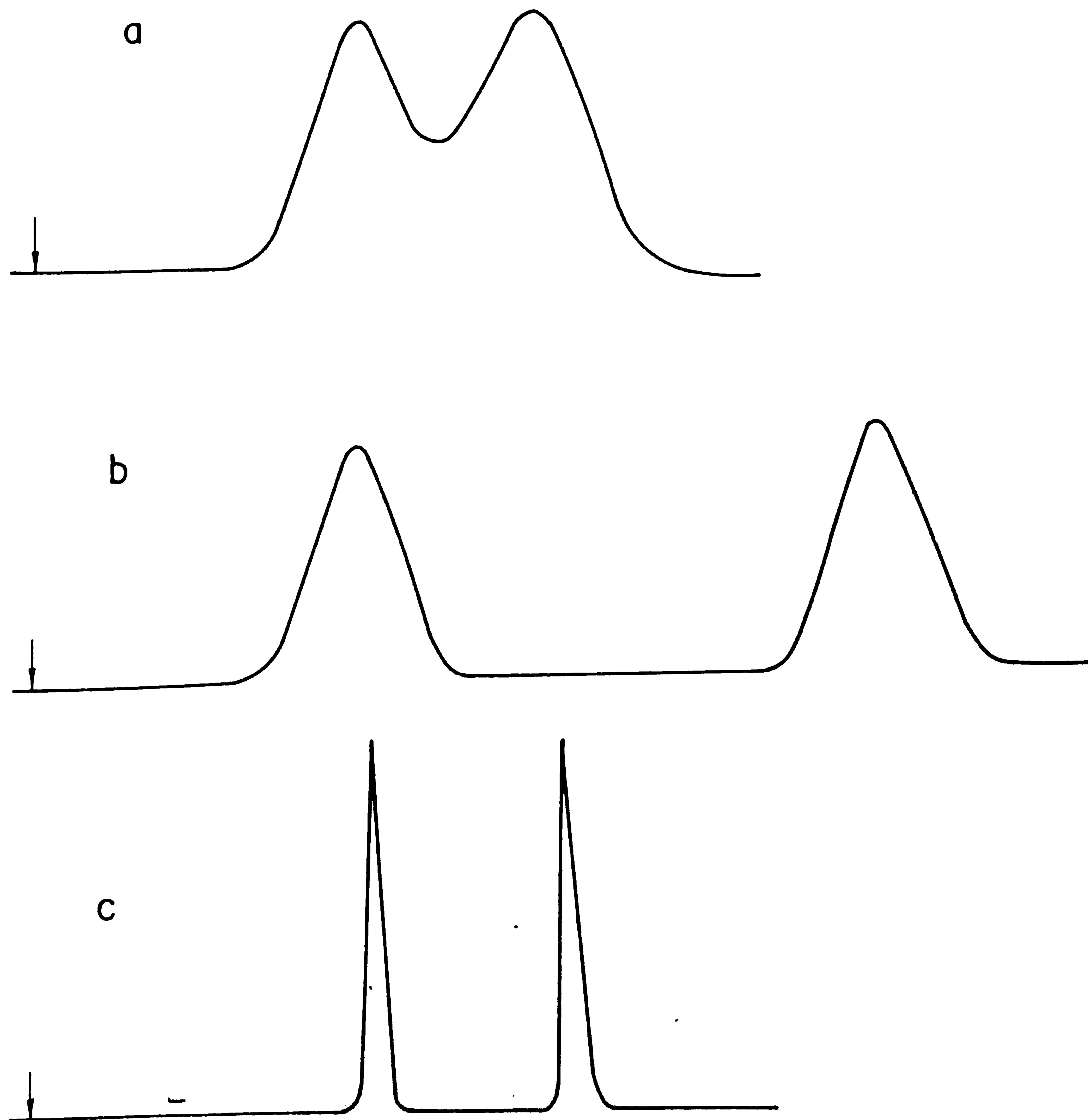



FIGURA I-7 Cromatogramas ilustrando a relação entre resolução, seletividade e eficiência. a: má resolução causada por má eficiência e má seletividade; b: boa resolução devido a boa seletividade, porém com má eficiência; c: boa resolução com boa eficiência e boa seletividade.

A otimização da resolução está relacionada com os parâmetros experimentais na equação geral da resolução:

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4}\left[\frac{D_{m2}}{D_{m2}+1}\right]\left[\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right],$$

que apresenta termos relacionados à eficiência, representada pelo número de pratos teóricos; à distribuição dentro da coluna, representada pela razão de distribuição das massas, D_m, e à seletividade, representada pelo fator de separação, α. Mudanças nestes três termos geram mudanças na resolução e, conseqüentemente, na separação.

A equação geral de resolução pode ser rearranjada, permitindo o cálculo do número de pratos requeridos para uma determinada separação.

$$n_{req} = 16 R_S^2 \left[\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right]^2 \left[\frac{D_{m2}+1}{D_{m2}}\right]^2$$

Este número é útil na determinação do comprimento da coluna necessário para conseguir-se a separação.

Nos Apêndices 1 a 3 são sumarizados estes e outros termos básicos à cromatografia com suas respectivas definições.

5. REFERÊNCIAS

5.1. Gerais

- BRAITHWAITE, A. e SMITH, F.J. *Chromatographic Methods*, 4ª edição, Chapman and Hall, London, 1985, capítulos 1 e 2.
- COLLINS, C.H.; DE AQUINO NETO, F.R. e DA SILVA, J.R.P. *Quím. Nova*, *11*, 443 (1988).
- GROB, R.L., ed. *Modern Practice of Gas Chromatography*, 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1985, capítulos 1 e 2.
- JOHNSON, E.L. e STEVENSON, R. *Basic Liquid Chromatography*, 2ª edição, Varian Associates, Palo Alto, 1978, capítulos 1 e 2.
- McNAIR, H.M. e BONELLI, E.J. *Basic Gas Chromatography*, 5ª edição, Varian Associates, Palo Alto, 1969, capítulos 1 e 2.
- SNYDER, L.R. e KIRKLAND, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1979, capítulos 1 e 2.

5.2. Históricas

- ABEL, E.W.; POLLAND, F.W.; UDEN, P.C. e NICKLESS, G.D. *J. Chromatogr.*, *22*,23 (1966).
- ADAMS, B.A. e HOLMES, E.L. *J. Soc. Chem. Ind.*, *54*, 1 (1935).
- BEYERINCK, M.W. *Z. Physik. Chem.*, *3*, 110 (1889).

- CAMPBELL, D.H.; LUESCHER, E. e LERMAN, L.S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.), *37*, 575 (1951).
- COHN, W.E. *Science*, *109*, 377 (1949); *J. Am. Chem. Soc.*, *71*, 2275 (1949).
- CONSDEN, R.; GORDON, A.H. e MARTIN, A.J.P. *Biochem. J.*, *38*, 244 (1944).
- CREMER, E. e PRIOR, F. *Osterr. Chem. Ztg.*, *50*, 161 (1949).
- CUATRACASAS, P.; WILCHEK, M. e ANFINSEN, C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.), *61*, 636 (1968).
- DAY, D.T. *Proc. Am. Phil. Soc.*, *36*, 112 (1897).
- GOLAY, M.J.E. em DESTY, D.H., ed. *Gas Chromatography 1958*, Butterworths, London, 1958, p.36.
- GOUW, T.H. e JENTOFT, R.E . *J. Chromatogr.*, *68*, 303 (1972).
- HALASZ, I. e HORVATH, C.G. *Anal. Chem.*, *36*, 1178 e 2226 (1964).
- HAMILTON, P.B. e ANDREWS, R.A. *Anal. Chem.*, *31*, 1504 (1959).
- HARLEY, J.; NIL., W. e PRETORIUS, V. *Nature (London)*, *181*, 177 (1958).
- HESSE, G.; EILBRACHT, H. e REICHENDER, F. *Liebigs Ann. Chem.*, *546*, 233 (1941).
- HORVATH, C.G.; PREISS, B.A. e LIPSKY, S.F. *Anal. Chem.*, *39*, 1423 (1967).
- HOWARD, G.A. e MARTIN, A.J.P. *Biochem.* J., *46*, 532 (1950).
- HUBER, J.F.K. e HULSMAN, J.A.R.J. *Anal. Chim. Acta*, *38*, 305 (1967).
- IZMAILOV, M.A. e SCHRAIBER, M.S. *Farmatsiya*, *3*, 1 (1938).
- JAMES, A.T. e MARTIN, A.J.P. *Biochem.* J., *50*, 679 (1952).
- JENTOFT, R. e GOUW, T.H. *Anal. Chem.*, *38*, 949 (1966).
- KARR, C. Jr.; CHILDERS, E.E. e WARNER, W.C. *Anal. Chem.*, *35*, 1290 (1963).
- KIRCHNER, J.G.; MILLER, J.M. e KELLER, G.J.; *Anal. Chem.*, *23*, 420 (1951).
- KIRKLAND, J.J. *Anal. Chem.*, *40*, 391 (1968).
- KIRKLAND, J.J. *J. Chromatogr.* Sci., *10*, 593 (1972).
- KLESPER, E.; CORWIN, A.H. e TURNER, D.A. *J. Org. Chem.*, *27*, 700 (1962).
- KUHN, R. e LEDERER, E. *Naturwissenschaften*, *19*, 306, (1931); *Ber. Deutch. Chem. Gesell.*, *64*, 1349 (1931).
- MARTIN, A.J.P. e SYNGE, R.L.M. *Biochem. J.*, *35*, 1358 (1941).
- McWILLIAMS, T.G. e DEWAR, R.A. *Nature (London)*, *181*, 760 (1958).
- MOORE, J.C. *J. Polymer Sci.*, *A2*, 835 (1964)
- MOORE, S. e STEIN, W.H. *J. Biol. Chem.*, *192*, 663 (1951).
- MORHY, L. *Ciênc. Cult.*, *28*, 1185 e 1189 (1976).
- PORATH, J. e FLODIN, P. *Nature (London)*, *183*, 1657 (1959).
- REED, L. *Proc. Chem. Soc.*, *9*, 123 (1893).
- RUNGE, F.F. *Ann. Phys. Chem.*, *31*, 65 (1834); *32*, 78 (1834).
- SCHOENBEIN, C.F. *Poggendorf's Ann.*, *42*, 422 (1837).
- SCOTT, R.P.W. e KUCERA, P. *J. Chromatogr.*, *125*, 251 (1976).
- SNYDER, L.R. *Anal. Chem.*, 39, 698 (1967).
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. e MOORE, S. *Anal. Chem.*, *30*, 1190 (1958).
- STAHL, E. *Pharmazie*, *11*, 633 (1956).
- TSUDA, T. e NOVOTNY, M. *Anal. Chem.*, *50*, 27 (1978).
- TSWETT, M. Ber. *Deutch. Botan. Gesell.*, *24*, 316 e 384 (1906).

CAPÍTULO II

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Gilberto Leite Braga
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUCÃO

A cromatografia em papel, desenvolvida por CONSDEN, GORDON e MARTIN em 1944, é uma técnica simples, utiliza pequena quantidade de amostra, tem boa capacidade de resolução e aplica-se, de preferência, na separação e identificação de compostos polares como antibióticos hidrossolúveis, ácidos orgânicos e íons metálicos. Segundo BROWNING e col., classifica-se como cromatografia por partição líquido-líquido e na classificação dos métodos cromatográficos apresentada por COLLINS e col. como cromatografia planar líquido-líquido.

A separação ou distribuição dos componentes de uma mistura, na cromatografia líquido-líquido em papel, relaciona-se com as diferentes solubilidades relativas destes componentes, na fase móvel e fase estacionária. Os componentes menos solúveis na fase estacionária têm uma movimentação mais rápida ao longo do papel, enquanto que os mais solúveis na fase estacionária serão seletivamente retidos, tendo uma movimentação mais lenta.

Este mecanismo de separação pode ser explicado da seguinte maneira: a celulose é constituída por 2.000 ou mais unidades de glicose anidra ligadas por átomos de oxigênio; um líquido polar como a água tem grande afinidade pelas hidroxilas de cada glicose, formando pontes de hidrogênio, ficando retido e funcionando como fase estacionária, e os líquidos menos polares (solventes orgânicos) são repelidos por esta estrutura e funcionam como fase móvel.

A cromatografia em papel é uma microtécnica muito útil para a separação de componentes de uma mistura e realização da análise qualitativa dos mesmos em função dos R_f (fatores de retenção) e cores apresentadas. Pode-se também realizar a análise quantitativa, utilizando-se o densitômetro, bem como a extração dos componentes separados mediante um solvente adequado, e então, utiliza-se um método instrumental para quantificar o componente isolado.

A forma mais simples da cromatografia em papel é a cromatografia ascendente que utiliza uma tira de papel de comprimento e largura variáveis, em função da cuba cromatográfica a ser utilizada. Marca-se com lápis o ponto de partida da amostra, a uns 2 cm de uma das bordas do papel, e marca-se também a linha de chegada da fase móvel (ou frente do solvente), geralmente distando 10 cm do ponto de partida. Dependendo da largura do papel, pode-se colocar apenas uma alíquota do padrão ou da amostra, centralizando-se esta aplicação na linha de partida. No caso da possibilidade de colocar-se mais de uma alíquota no ponto de partida, deixa-se 2 cm de distância das bordas laterais e um intervalo entre os pontos de aplicação de 1,5 a 2,0 cm.

A largura da tira do papel, acima da linha de chegada da fase móvel, deve ser igual ao diâmetro interno da cuba, de maneira que o papel fique suspenso na vertical, impedindo de deslizar-se para baixo. O nível da fase móvel deve ficar abaixo do ponto de partida da substância, devendo, sempre, haver uma boa vedação da cuba cromatográfica para que não se perca o vapor desta fase *(Figura II-1)*.

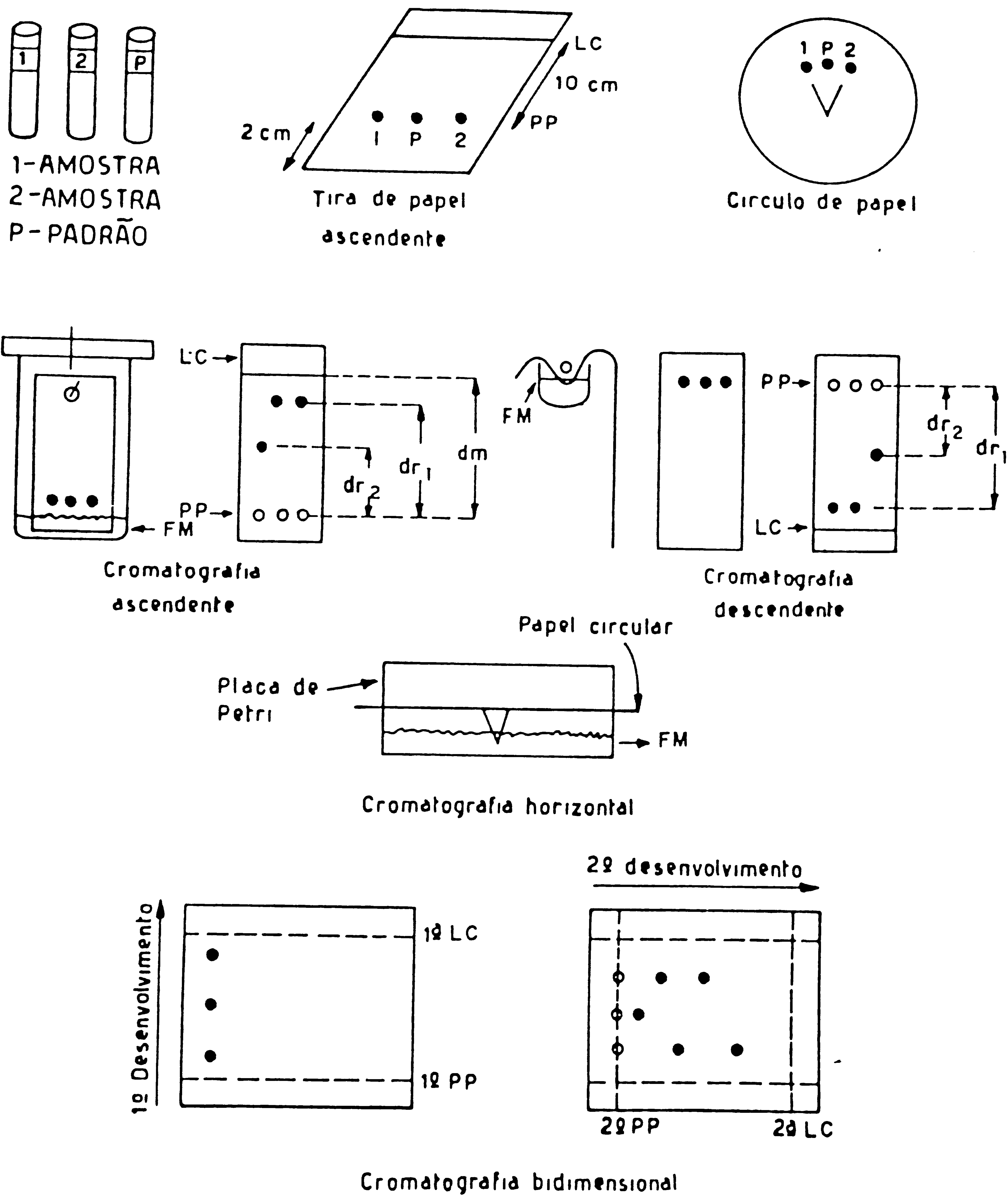



FIGURA II-1 Diferentes tipos de cromatografia em papel de acordo com as técnicas de desenvolvimento.
FM: fase móvel; PP: ponto de partida; LC: linha de chegada da fase móvel; dr1 e dr2: distâncias percorridas pelas substâncias; dm: distância de migração da fase móvel.

Por capilaridade a fase móvel começa a se movimentar em fluxo ascendente, inicialmente rapidamente, diminuindo gradativamente até parar por completo quando a força ascendente da capilaridade for neutralizada pela ação da gravidade. Quando a fase móvel atingir a linha de chegada, geralmente a 10 cm do ponto de partida, retira-se o papel da cuba cromatográfica e seca-se a tira de papel com secador de cabelo com ar quente ou frio até eliminar-se a fase móvel. No caso de mistura de substâncias de componentes coloridos, à medida que ocorrer a separação, a cor única se desdobrará em cores distintas em função do número de substâncias que a compõem. No caso de mistura de substâncias incolores pode-se detectar (revelar) estes componentes por técnicas diversas.

A análise qualitativa de uma substância realiza-se através de seu R_f que se determina utilizando-se a expressão:

$$R_f = \frac{\text{distância (cm, mm) percorrida pela substância}}{\text{distância (cm, mm) percorrida pela frente da fase móvel}}$$

Na prática, a distância percorrida pelo soluto em um tempo determinado, mede-se desde o ponto de aplicação ou ponto de partida da amostra até o centro da mancha, e a distância percorrida pela fase móvel, desde o ponto de partida até o ponto extremo atingido por ela, L_c, a linha de chegada da fase móvel (*Figura II-1*).

O R_f é uma constante física de uma determinada substância, desde que se observem as características do papel, a qualidade e quantidade da fase móvel, a temperatura, o volume e a concentração da substância aplicada.

É aconselhável, quando se realiza a análise qualitativa e quantitativa de uma substância ou mistura de substâncias, trabalhar com padrão e amostra de forma a mais semelhante possível e fazer-se a análise de ambos nas mesmas condições, evitando-se desta maneira, os erros de análise devidos ao papel, fase móvel, temperatura, etc.

Uma separação adequada dos componentes de uma mistura está também relacionada com a difusão em função da concentração, difusão lateral, equilíbrio incompleto, soluto, fase móvel e fase estacionária.

A separação dos componentes de uma mistura pode ser incompleta (superposição das manchas) ou por causa da movimentação do soluto de regiões de maior concentração para regiões de menor concentração ou por difusão lateral, quando soluto e a fase móvel percorrem distâncias diferentes (percursos laterais em determinadas regiões do papel) ou ainda também por fluxo rápido, não dando um tempo ideal de contacto do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. Uma sugestão para a resolução destes problemas é a de que se procure trabalhar nas condições mais próximas possíveis, de qualidade e quantidade, entre padrão e amostra, usando-se o mesmo papel, fase móvel, temperatura, etc., isto é, cromatografando-se, concomitantemente, padrão e amostra em condições absolutamente idênticas.

2. DEFINIÇÕES E TERMOS USADOS NA CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Cromatografia em papel (CP): método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, em função do deslocamento diferencial de solutos, arrastados por uma fase móvel, sendo retidos seletivamente por uma fase estacionária líquida (água), na cromatografia com fase normal.

1º → **Suporte**: papel sobre o qual fica retida a fase estacionária, água.

2º → **Fase móvel**: um líquido ou mistura de líquidos que fluem através do papel, arrastando os solutos.

5° → **Revelador ou Agente cromogênico:** agente físico (U.V., por exemplo) ou químico (por ex., vapores de iodo) que tornam visíveis as substâncias separadas pela cromatografia em papel.

4° → **Resolução:** distância mínima em que se encontram duas manchas sendo ainda possível distingui-las individualmente.

Desenvolvimento: é o movimento diferencial dos componentes de uma amostra, ao serem deslocados pela fase móvel. Em função de sua direção podemos ter: *ascendente*, de baixo para cima; *descendente*, de cima para baixo; *horizontal*, do centro para a periferia conforme um círculo imaginário traçado no plano horizontal.

Aplicação: colocação da solução da amostra (mistura das substâncias) no ponto de partida sobre o papel cromatográfico.

Frente da fase móvel: linha de chegada da fase móvel, visível ainda quando se retira o papel da cuba cromatográfica.

Distância percorrida: distância percorrida pela fase móvel, desde o ponto de partida até a linha de chegada (geralmente 10 cm) ou a do componente, no mesmo tempo.

R_f: o quociente entre as distâncias percorridas simultaneamente desde o ponto de partida, até o centro de maior concentração da mancha do soluto e até a frente da fase móvel.

Câmara ou Cuba cromatográfica: recipiente de vidro com tampa fechada hermeticamente, não deixando escapar vapores da fase móvel e onde se coloca o papel de cromatografia.

Cromatograma: papel com as substâncias separadas.

Saturação da cuba: distribuição uniforme no interior da cuba da fase vapor da fase móvel após alcançado o equilíbrio (para obter-se a saturação deve-se colocar papéis de filtro, embebidos na fase móvel, aderidos às paredes laterais internas das cubas).

3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Empregam-se quantidades de amostras da ordem de microgramas a miligramas. A resolução depende da concentração e diâmetro da mancha aplicada. A análise é rápida, desde minutos, ou demorada, até horas. É fácil eluir as substâncias do papel. Substâncias hidrófilas são separadas com facilidade, as hidrófobas requerem tratamento especial do papel. As fases móveis devem estar saturadas com água. Usam-se cubas cromatográficas perfeitamente vedadas para manter-se o vapor do sistema solvente. O desenvolvimento pode ser ascendente, descendente, circular ou horizontal. Tem suporte flexível, muito prática no preparo do suporte; é só cortar o papel de cromatografia. O R_f é reprodutível para caracterização; distâncias percorridas pela frente da fase móvel variam de 10 a 100 cm. Deve-se ter um controle rigoroso das condições. Substâncias corrosivas não servem como agentes cromogênicos e tem-se condições limitadas para revelar. Existe um número limitado de suportes: papel e seus derivados; inadequada para a seleção da fase móvel para a cromatografia em coluna; ótima para acompanhar o desenvolvimento de uma técnica de separação de produtos e pode ser quantitativa. A CP tem sensibilidade regular, porque há difusão da amostra, particularmente quando os R_f são altos.

As explicações anteriores tratam principalmente dos aspectos elementares da cromatografia em papel; relatam-se, a seguir, mais explicações sobre a teoria e a prática desta técnica, assim como, sobre as aplicações e as variáveis (papel, fase móvel e temperatura).

3.1. Papel

O suporte na cromatografia em papel é uma tira retangular ou uma folha circular de papel que funciona como uma camada fina de celulose. Deve-se observar que o papel cromatográfico é uma variável muito importante e, dependendo da amostra a ser analisada, empregar (testar) os papéis das marcas Whatman *(Tabela II-1)*, S & S (Schleicher e Schull) e Macherey-Nagel.

Para usos especiais é preferível modificar-se o papel; os mais utilizados são:

a. Papel acetilado - útil para separar substâncias hidrófilas.

b. Papel impregnado - emprega-se na separação de substâncias moderadamente hidrófobas ou hidrófilas. O papel é umedecido ou com silicona, ou com parafina, ou com dimetilformamida ou aminas de alto peso molecular.

c. Papel carregado - dispersão de resinas poliestirênicas, trocadoras de íons, nas fibras de celulose, permitindo a separação de substâncias orgânicas e inorgânicas.

d. Papel de fibra de vidro - as fibras de celulose são substituídas por fibras de vidro (Whatman Gf 81, 82 e 83), usa-se para condições extremas de temperatura e de acidez, e devem ser impregnados com suspensões aquosas de sílica gel ou alumina.

e. Papel tratado - para substâncias anfóteras ou com muitas hidroxilas.

Tabela II-1

Principais tipos de papéis Whatman utilizados em cromatografia

Nº	Observações	Espessura (mm)	Distância aproximada (mm) percorrida pela água após 30 minutos em CP ascendente
1	Mais citado e o mais utilizado dos papéis	0,16	130
2	Velocidade de fluxo um pouco menor que o anterior	0,18	120
3	Papel espesso com superfície rugosa que se usa para grande quantidade de amostra	0,38	130
3MM	Papel espesso que se usa também para grande quantidade de amostra, fluxo mais lento que o anterior	0,33	120
4	Papel com velocidade de fluxo mais rápida que os anteriores	0,20	140
540	Papel previamente lavado com ácido clorídrico diluído para eliminar cátions e ânions que possam interferir em determinadas separações. Superfície muito lisa	0,10	90

3.2. Fase móvel

A fase móvel na cromatografia em papel é a variável que possui maior efeito nas separações dos componentes de uma mistura. Considerando um par de líquidos, o menos polar funciona como fase móvel e o mais polar, como fase estacionária (cromatografia com fase normal). Para uma separação particular dos componentes de uma mistura, tem que se levar em consideração a natureza química das substâncias que devem ser separadas, assim como, a viscosidade e a polaridade da fase móvel *(Tabela II-2)*.

Tabela II-2

Algumas fases móveis ordenadas em função de suas polaridades

	Solubilidade da água (g/100 mL a 20°C)	Constante dielétrica (20°C)	Viscosidade (mPa.s a 20°C)
Éter de petróleo (30-60°C)	imiscível	1,84	0,3
Hexano	imiscível	1,88	0,32
Benzeno	0,08	2,29	0,65
Éter dietílico	7,50	4,34	0,23
Clorofórmio	0,82	4,80	0,57
Acetato de etila	8,60	6,02	0,45
Dicloroetano	0,60	10,40	0,79
Butanol-2	12,50	17,80	4,21
Acetona	miscível	21,50	0,32
Etanol	miscível	24,60	1,20
Metanol	miscível	33,60	0,60
Água	miscível	80,40	1,00

Ácidos orgânicos são razoavelmente solúveis em água.
Ácidos e bases inorgânicos são altamente solúveis em água.

3.3. Efeitos da temperatura

A temperatura na cromatografia em papel deve ser controlada porque, em função desta variável, pode-se aumentar a capacidade de resolução da técnica. Teoricamente, tem-se um tempo ideal de contacto entre o soluto e as fases estacionária e móvel para que ocorra uma partição mais completa possível em decorrência de uma movimentação ideal da fase móvel, através do papel, relacionada com a temperatura da experiência.

A temperatura ideal vai depender da amostra a ser analisada, assim como, do papel e da fase móvel que serão usados. A temperatura acima daquela do ambiente melhora o tempo de análise, mas pode prejudicar a resolução da mesma. Temperatura abaixo da do ambiente pode melhorar a resolução, mas prejudica o tempo de análise. Pode-se trabalhar na temperatura ambiente com um tempo e resolução de análise ideais para casos particulares. Em laboratórios bioquímicos, com o emprego de estufas de cultivo a

37°C pode-se trabalhar com temperaturas mais elevadas que a ambiente e de uma forma controlada. É muito importante manter-se uma temperatura para conseguir-se reprodutibilidade do R_f, porque este varia com a temperatura.

Existem laboratórios onde se realiza a cromatografia em papel, em locais com temperatura controlada, constante, ou com variações de frações de graus.

Deve-se observar que o papel, a fase móvel e a temperatura são variáveis que interferem na resolução da análise cromatográfica em papel, assim como na reprodutibilidade do R_f ; mas isto tudo pode ser controlado quando se trabalha com um padrão interno ou quando se prepara uma solução padrão quali e quantitativamente o mais semelhante possível da amostra, e realiza-se a análise do padrão e da amostra nas mesmas condições do papel, fase móvel, temperatura, etc.

4. CROMATOGRAFIA EM PAPEL COM FASE NORMAL E COM FASE REVERSA

4.1. Cromatografia em papel com fase normal

O papel é saturado ou tratado com a fase estacionária polar. O desenvolvimento cromatográfico é com uma fase móvel relativamente apolar.

4.1.1. Fase estacionária aquosa

O papel é saturado com vapor de água ou com vapor de água e outro solvente no interior de uma cuba cromatográfica, hermeticamente fechada, antes de iniciar-se o desenvolvimento cromatográfico.

4.1.2. Fase estacionária não aquosa

O papel é tratado (embebido) em solução de acetona e dimetilformamida, por 10 a 15 minutos, e depois deixa-se secar. As suas propriedades são sumarizadas na *Tabela II-3*.

Tabela II-3

Tratamentos do papel		
Fase estacionária	Papel tratado com solução de acetona e dimetilformamida (fase normal)	Papel tratado com parafina, óleo ou silicone, dissolvidos em solvente orgânico (fase reversa)
Fase móvel	apolar ou de baixa polaridade	polaridade média ou alta
Após desenvolvimento no ponto de partida na linha de chegada	substâncias hidrófilas substâncias hidrófobas	substâncias hidrófobas substâncias hidrófilas

4.2. Cromatografia em papel com fase reversa

O papel é tratado com substâncias hidrófobas (parafina líquida, óleo, silicona) dissolvidas em solventes orgânicos como éter de petróleo, hexano e benzeno . Emprega-se, como fase móvel, uma fase polar (isto é, o inverso do normal). Nesta técnica, separam-se solutos hidrófobos. Segundo BARNARD e CHAYEN, pode-se preparar papéis com fase reversa muito facilmente: papéis Whatman nº 3 são empregnados com solução de parafina líquida (ou de vaselina, ou de silicona etc.) em éter, na maioria dos casos, soluções a 5 ou a 10 por cento. Após a imersão por 5 minutos, levanta-se o papel para evaporar o éter. As suas propriedades encontram-se na *Tabela II-3*.

5. TÉCNICA DA CROMATOGRAFIA EM PAPEL

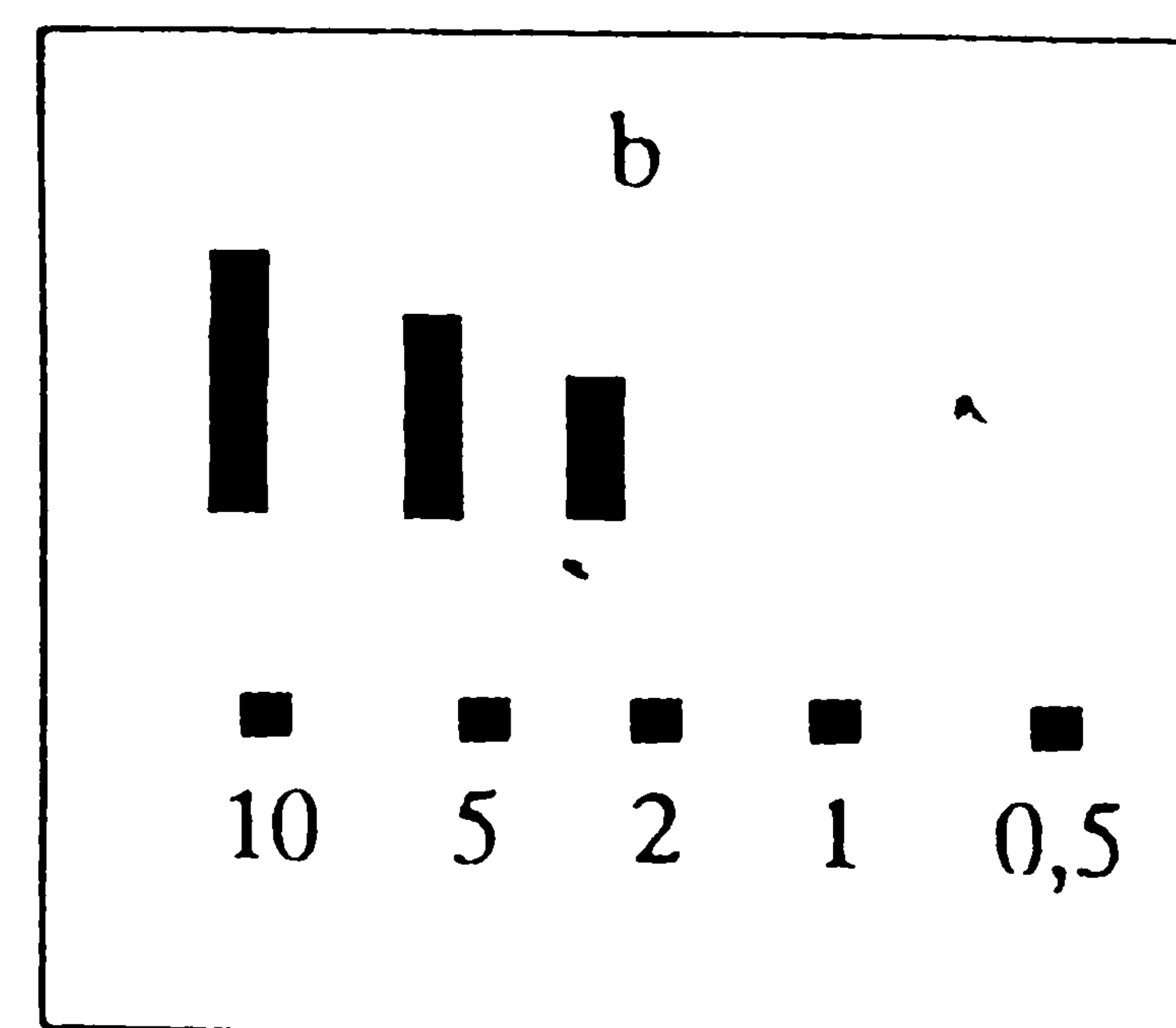
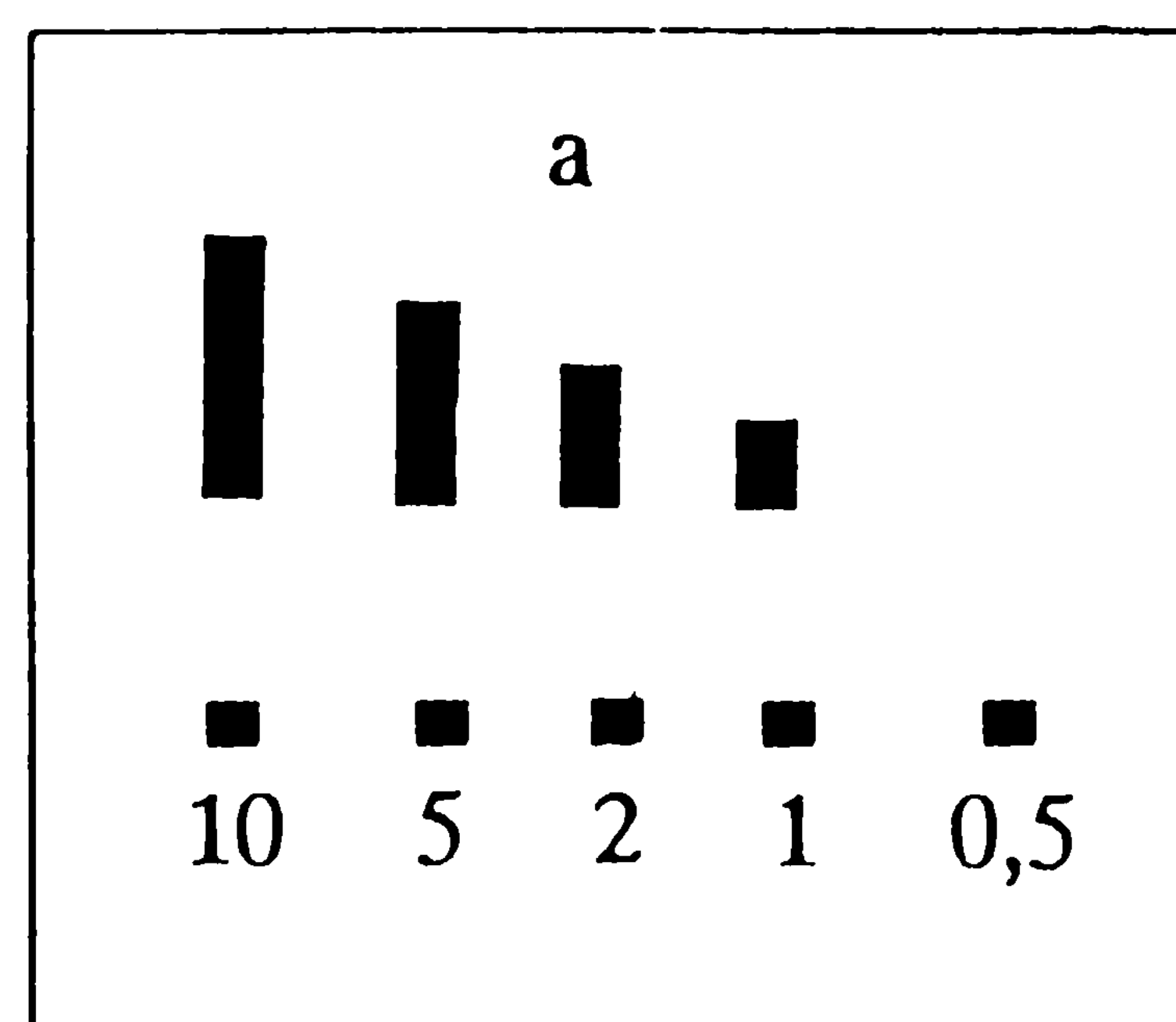
5.1. A amostra

A amostra a ser analisada (de 1 a 100 mg) deve estar dissolvida de preferência em um solvente volátil, empregando o menor volume possível, sendo recomendados: éter etílico, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol, etc. A quantidade de amostra aplicada depende da técnica utilizada, mas, quanto menor a quantidade, maior a capacidade de resolução. O volume da solução da amostra a ser empregado deve dar uma mancha no papel de cerca de 0,5 cm de diâmetro máximo.

5.2. Aplicação da amostra

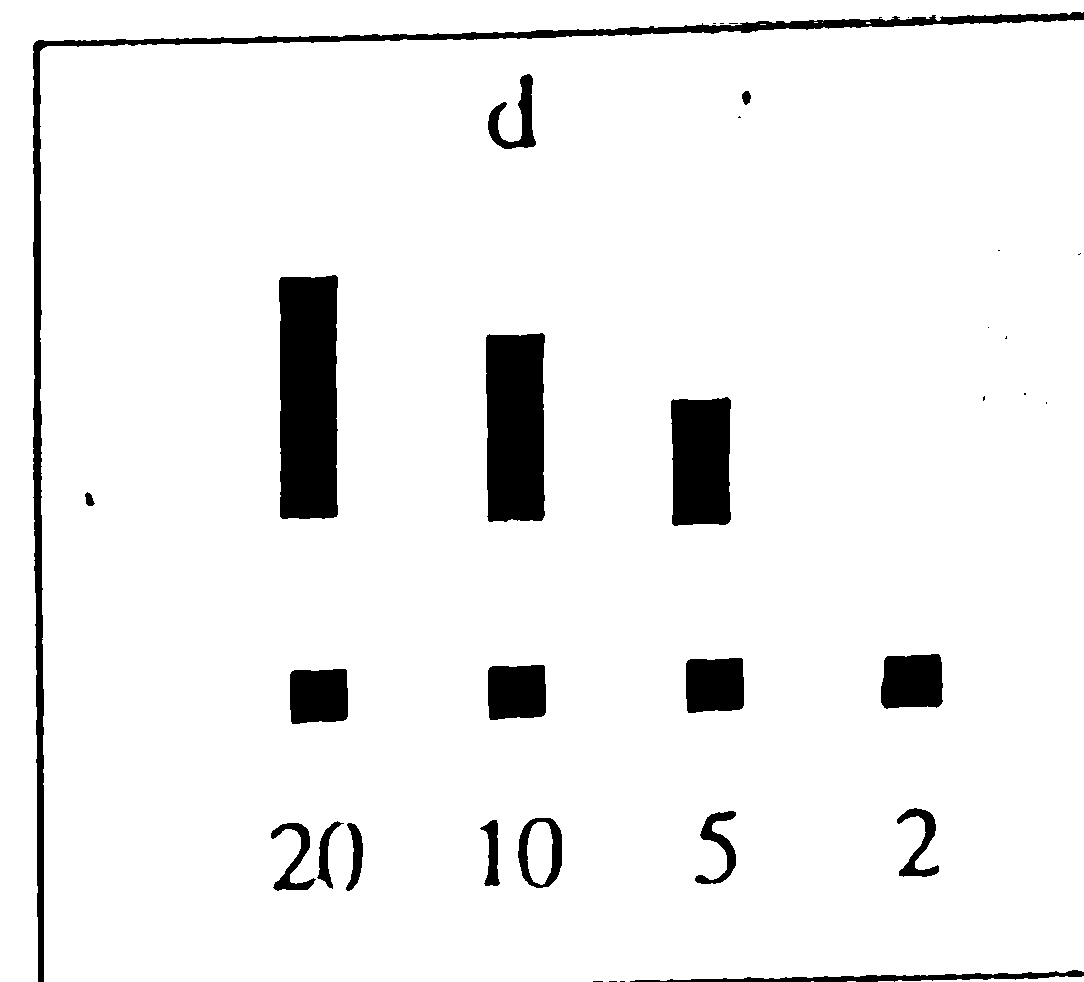
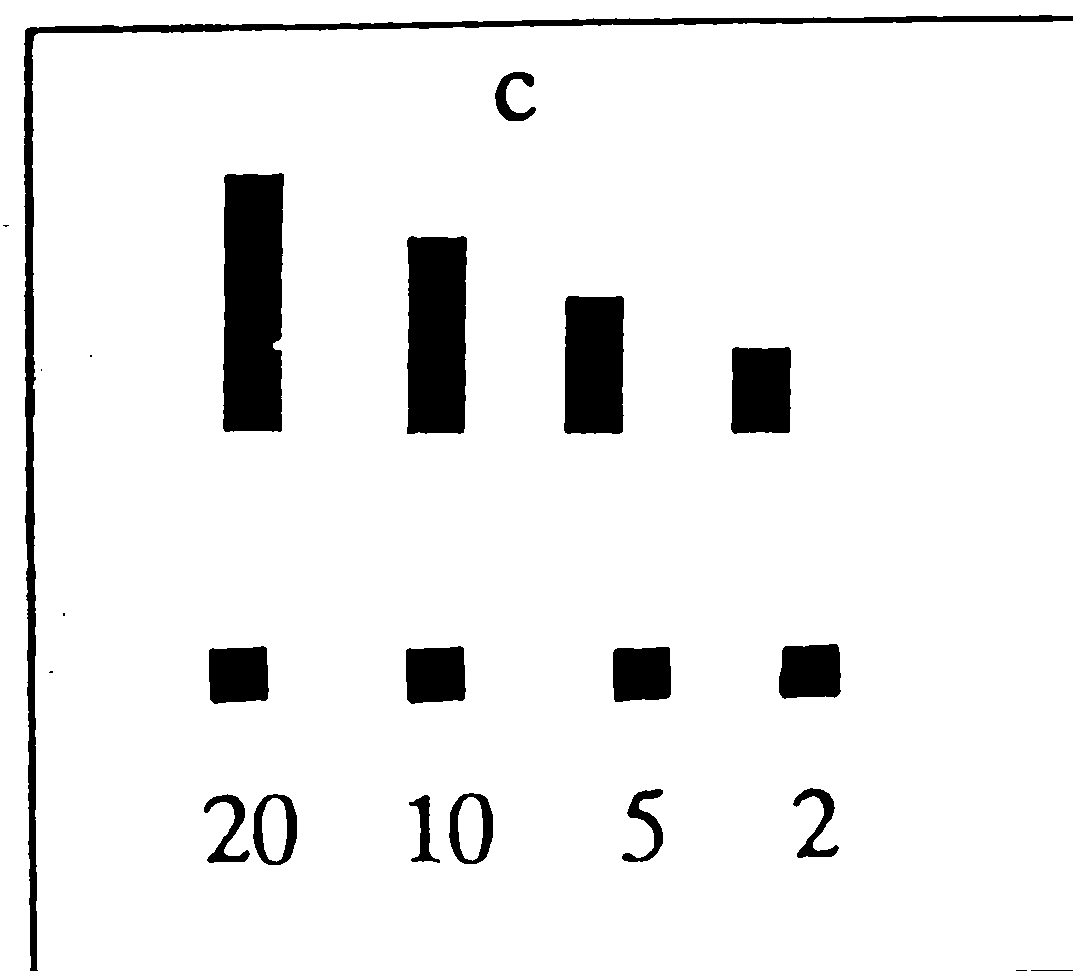
O volume de amostra a ser aplicado vai depender da sensibilidade da reação cromogênica empregada na sua revelação. Aconselha-se trabalhar da seguinte maneira: preparam-se soluções padrões quali e quantitativamente semelhantes às das amostras a serem analisadas; aplicam-se no papel de cromatografia; desenvolve-se o cromatograma; revela-se pelo agente cromogênico e então verifica-se qual a diluição mínima dos padrões que deu sensibilidade à reação cromogênica (mancha nítida que dê segurança de análise).

Exemplo: Padrão das substâncias *a* e *b*

Substância	a	b
um microlitro de cada solução (ppm)	10 5 2 1 0,5	10 5 2 1 0,5

Resultado: substância *a* foi sensível à reação cromogênica a partir de 1 μL da solução de 1 ppm; substância *b*, foi sensível à reação cromogênica a partir de 1 μL da solução de 2 ppm.

A seguir, procede-se com as amostras da seguinte maneira:

Exemplo: amostras *c* e *d*.

Amostra	c	d
Volumes aplicados (μL)	20 10 5 2	20 10 5 2

Aplica-se 1 μL por vez, secando-se com ar quente ou frio para manter-se o diâmetro da mancha aplicada em torno de 0,5 cm. Após toda aplicação e desenvolvimento do cromatograma, revelam-se as manchas com o agente revelador.

Resultado: No caso da amostra *c* o volume ideal para análise é de 2 μL e no da amostra *d*, de 5 μL..

A aplicação das soluções padrões e das amostras é realizada, preferencialmente, através de microsseringas ou, alternativamente, por meio ou de micropipetas ou de tubos capilares adequadamente preparados para esse fim.

6. MÉTODOS DE DETECTAR AS SUBSTÂNCIAS SEPARADAS

Quando a fase móvel atinge a linha de chegada, retira-se o papel da cuba cromatográfica e seca-se com o auxílio de ar frio ou quente de um secador de cabelos. Normalmente, as substâncias separadas são incolores ou invisíveis à luz ordinária, necessitando de artifícios externos para serem observadas. Empregam-se métodos químicos, físicos, biológicos ou enzimáticos para detectar (revelar e localizar) as substâncias separadas.

6.1. Métodos químicos

A solução reveladora é borrifada sobre o papel usado na cromatografia, sendo cada amostra uma mistura de substâncias como íons inorgânicos, carboidratos, inseticidas, etc. Existem na literatura fontes que informam qual deve ser a solução reveladora (agente cromogênico) a ser empregada, qual a técnica de preparo e modo de conservação, qual a sensibilidade e quais as substâncias detectadas por certos reveladores. Para exemplificar, vamos considerar a detecção de íons chumbo: usando a ditizona (difeniltiocarbazona) a 0,05% em tetracloreto de carbono (solução I) seguida de borrifação com hidróxido de amônia a 25% (solução II), aparecerá uma mancha de coloração intensa e característica porque houve a formação, no local do papel onde se encontrava o íon, do quelato ditizonato de chumbo, complexo formado somente após as borrifações seguidas das soluções I e II sobre o papel.

Muitas substâncias orgânicas absorvem radiações de luz ultravioleta e tornam-se fluorescentes. O papel, quando tratado com solução de fluoresceína, freqüentemente destaca as manchas tornando-as amarelo-esverdeadas, brancas ou azuis. Entretanto, as substâncias que absorvem a luz UV aparecem como manchas escuras sobre um fundo fluorescente azulado, normalmente apresentado pelo papel. Podem ser usadas lâmpadas UV de onda curta (240-260 nm) e onda larga (360 nm). É aconselhável trabalhar-se em ambiente com luminosidade apropriada para melhor observação.

6.3.Métodos biológicos e enzimáticos

Os métodos para localizar antibióticos por bioautografia baseiam-se na inibição do crescimento de certos microorgânismos. As substâncias biologicamente inativas, os produtos de sua decomposição e as impurezas não alteram a proliferação de tais microorganismos.

Os métodos enzimáticos podem servir ou para localizar enzimas ou os seus substratos. Assim, para localizar amilases, por exemplo, desenvolve-se o cromatograma, borrifa-se o papel com solução de amido, incuba-se umas 24 horas à temperatura controlada e depois borrifa-se com solução de iodo. As amilases apresentam-se como manchas brancas em fundo azul, o qual reflete a cor do complexo iodo-amido enquanto as manchas brancas indicam a posição das enzimas que degradarem o amido.

7. ANÁLISE QUALITATIVA

Na cromatografia em papel, a análise qualitativa é realizada normalmente em função da cor e do R_f apresentados pela substância. É aconselhável desenvolver-se um cromatograma tendo a amostra e as substâncias (padrões) prováveis de constituírem esta amostra colocadas lado a lado, pois, assim alcança-se a situação que visa dar igualdade de condições a ambos, padrão e desconhecido. Às vezes é necessário mais de um desenvolvimento do solvente para atingir-se o ideal, isto é, que os componentes da amostra e os padrões, colocados ao lado, apresentem o máximo possível de igualdade, quali e quantitativamente.

No caso de substância desconhecida, esta, depois de perfeitamente separada, deve ser eluída do papel e submetida a uma técnica instrumental adequada, tal como a espectrometria de massa, o infra-vermelho, a ultravioleta, a absorção atômica, a fluorescência por raios-X, etc., para sua identificação.

8. ANÁLISE QUANTITATIVA

Para realizar-se a análise quantitativa em cromatografia em papel, tem-se que, primeiramente, fazer a análise qualitativa e, em seguida, selecionar-se um sistema de fase móvel que separe perfeitamente as substâncias a serem analisadas e que produza manchas regulares, além de trabalhar-se com padrões quali e

quantitativamente semelhantes àquelas substâncias a serem determinadas na amostra. Pode-se fazer a determinação quantitativa da substância que foi separada diretamente no papel ou depois de extraída do mesmo.

8.1. Diretamente sobre o papel

8.1.1. Comparação da intensidade das cores reveladas

Trabalha-se com uma série de pontos de partida de diluições variáveis tanto do padrão como da amostra e, depois do cromatograma pronto, por comparação entre as intensidades das cores e dos tamanhos das manchas do padrão e da amostra que mais se aproximam, pode-se ter um resultado semiquantitativo, com um erro aproximado de mais ou menos 20 % podendo servir a determinadas análises.

8.1.2. Área da mancha

Depois do cromatograma pronto, corta-se a área correspondente à mancha e pesa-se a mesma. Constroem-se gráficos de área em função dos logaritmos das quantidades da substância presente na mancha. É importante que o tamanho da gota aplicada seja sempre o mesmo. Usa-se uma série de pontos de partida da solução padrão, com pouca diferença entre a concentração mínima e a máxima; desta maneira, pode-se dar o resultado da análise em função do gráfico traçado. Aconselha-se, para uma maior exatidão, trabalhar-se com solução padrão quali e quantitativamente semelhante à amostra e realizar-se a análise nas mesmas condições de papel, solvente, cuba, temperatura, etc.

8.1.3. Análise densitométrica

Determina-se, diretamente sobre o papel, com um densitômetro, a intensidade da cor apresentada pela substância padrão e pela amostra, sendo o densitômetro constituído de uma fonte luminosa, filtro, colimador, fotocélula e microamperímetro. Existem aparelhos com registrador potenciométrico onde aparecem picos das substâncias, cujas áreas são proporcionais à concentração das substâncias. Mesmo com o densitômetro, aconselha-se trabalhar com padrão e amostra nas mesmas condições, para obter-se uma melhor exatidão.

8.2. Extração da substância

Para a extração da substância do papel podem ser utilizadas duas técnicas:

a. Aplica-se a substância em análise no papel, desenvolve-se o cromatograma, emprega-se um agente cromogênico para formação do derivado colorido, e depois de pronto, extrai-se o derivado colorido do papel e faz-se a leitura em espectrofotômetro; o resultado é dado em função da comparação deste com aqueles encontrados em uma curva de calibração desta mesma substância, previamente determinada nestas mesmas condições.

b. As substâncias, depois de separadas, são extraídas do papel e depois quantificadas por métodos analíticos (espectrofotometria, microtitulação, micrograviметria, etc.). Para a extração, delimita-se a região do papel onde deve estar a substância a ser extraída, desenvolvendo-se padrões nas laterais do papel e revelando-os, tendo-se o cuidado de proteger as substâncias que serão extraídas e, posteriormente, analisadas *(Figura II-2)*.

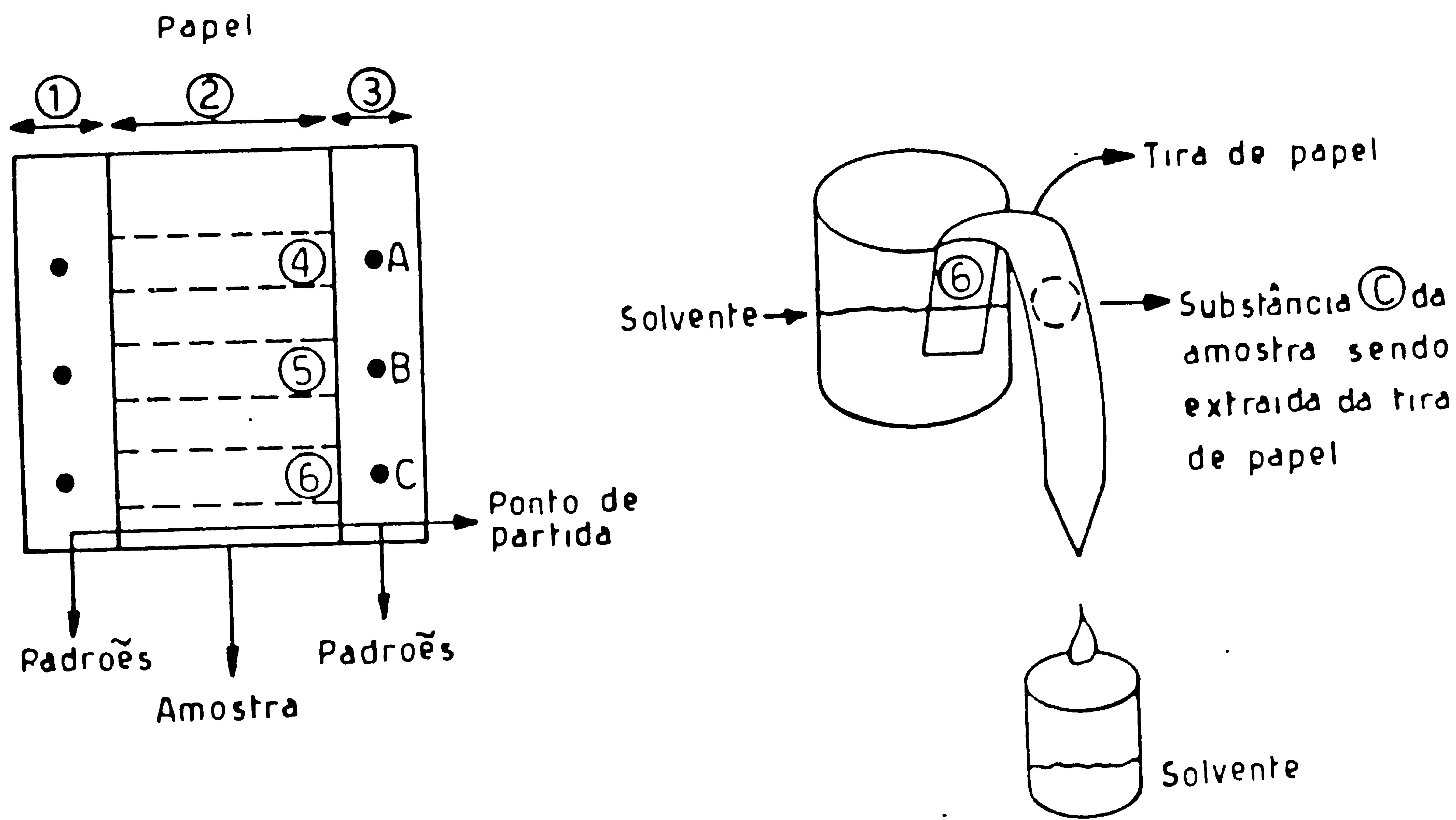



FIGURA II-2 Esquema de extração das substâncias depois de separadas. A, B e C: substâncias padrões; 1 e 3: regiões do papel borrifadas com o revelador; 2: região do papel não borrifada com o revelador; 4, 5 e 6: tiras de papel que contêm as substâncias A, B e C da amostra.

9. APLICAÇÕES DA CP

Esta técnica cromatográfica utiliza-se, de preferência, na separação e identificação de compostos polares, substâncias hidrófilas, como antibióticos hidrossolúveis, ácidos orgânicos e íons metálicos, etc., sendo mais prática que a cromatografia em camada delgada e de fácil reprodução de R_f para a caracterização.

É muito útil para acompanhar a seqüência de uma reação química ou de acompanhamento de separação de componentes de uma amostra e pode ser utilizada para a análise quantitativa.

Devemos lembrar que a cromatografia em camada delgada (celulose microcristalina "papel moído") é mais eficiente que a cromatografia em papel, mas para separações de componentes de amostras não muito complexas, esta técnica é muito útil e de fácil aplicação.

10. REFERÊNCIAS

- BARNARD, J.A. e CHAYEN, R. *Métodos Modernos de Analisis Quimico,* Ediciones Urmo, Espartero, Bilbao, 1965.
- BROWNING, D.R. *Cromatografia*, Toray-Masson, S.A., Barcelona, 1971.
- COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.F.; VALENTE, A.L.P.; MURTA, A.L.M. e McNAIR., H.M. *Quím. Nova*, *6*, 46 (1983).
- CONSDEN, R.; GORDON, A.H. e MARTIN, A.J.P. *Biochem. J.*, *38*, 224 (1944).
- EWING, G.W. *Métodos Instrumentais de Análise Química*, vol. 2, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1971.
- HAIS, I.; LEDERER, M.M.; e MACEK, K. *Identification of Substances by Paper and Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, New York, 1970.
- MANDSEN, B.C. *J. Chem. Educ., 50,* 852 (1973).
- RANDERATH, K.*Thin-Layer Chromatography*, 2ª edição, Academic Press, New York, 1968.
- *Reativos de Coloración para Cromatografia en Capa Fina y en Papel,* E. Merck, Darmstadt, 1972.
- SHERLLARD, E.J. *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, New York, 1968.
- STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography*, Academic Press, New York, 1965.

CAPÍTULO III

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

João Luis Callegari Lopes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica teve início com os trabalhos de IZMAILOV e SHRAIBER em 1938, sendo que somente a partir da década de 60 passou a ser largamente utilizada, de tal forma que hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análise de substâncias orgânicas e organometálicas.

O grande desenvolvimento desta técnica é conseqüência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da amostra em análise.

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Entretanto, usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrófilas.

2. OS ADSORVENTES

É disponível no mercado uma grande variedade de tipos de adsorventes para fins cromatográficos, podendo-se destacar fornecedores como "Merck", "Carlo Erba", "Woelm", "Fluka", "Macherey-Nagel" e "Baker", entre outros. Entre os adsorventes mais utilizados em CCD estão a sílica, alumina, celulose e poliamida.

2.1. Sílica (SiO_2)

Ácido silício amorfo, altamente poroso, é seguramente um dos adsorventes mais utilizados em cromatografia por adsorção. Apresenta caráter fracamente ácido, que pode ser aumentado pela presença de impurezas ácidas, podendo ocorrer como conseqüência fenômenos de quimiosorção de bases ou reações

ácido-catalizadas das amostras. Existem vários tipos de sílica disponíveis no comércio, de acordo com certas características adicionais de cada produto. Em vista disto, são encontradas nos rótulos dos frascos informações sobre estas características. Como exemplo citamos a simbologia utilizada pelos produtos "Merck": G indica a presença de aglutinantes (em geral com 10-15% de gesso, ou 1-3% de amido ou talco) com o objetivo de reter o adsorvente sobre a placa de vidro; H indica que não contém aglutinante; P é para uso em camada preparativa; F indica a presença de substâncias fluorescentes, sendo neste caso indicado o comprimento de onda onde ocorre a excitação da substância incorporada; R indica adsorvente extra puro, sem aditivos.

Em geral, a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcalóides, terpenóides e esteróides, usando o mecanismo de adsorção. Entretanto, quando não está ativada ou for desativada com vapor d'água, retém água suficiente para que as separações ocorram por um mecanismo semelhante à cromatografia em papel.

Na preparação de placas, mistura-se cerca de 30 g de sílica com 60-70 mL de água destilada. Esta quantidade de suspensão é suficiente para preparar cinco placas de 20 x 20 cm, com uma espessura da camada ao redor de 0,3 mm.

2.2. Alumina (Al_2O_3)

A alumina é, depois da sílica, o adsorvente mais utilizado. Tem características alcalinas, embora possa também ser preparada para apresentar características neutra ou ácida. Deve ser sempre considerada a possibilidade da alumina catalizar diversas reações orgânicas, como as condensações de compostos carbonílicos. Além daquela simbologia mencionada para a sílica, a alumina de produção da Merck pode também apresentar outras duas indicações do processo de fabricação: Tipo E, que apresenta superfície específica de cerca de 120-180 m^2/g, elaborada a temperaturas baixas; e Tipo T, com súperfície específica de cerca de 60-90 m^2/g, elaborada a temperaturas elevadas.

BROCKMAN e SCHADDER classificaram a alumina em cinco tipos (I a V) segundo sua capacidade de retenção de corantes azóicos. Este procedimento está descrito no Capítulo IV.

A alumina é geralmente empregada na separação de compostos lipofílicos e, pelo fato de poder ser preparada com características ácida, neutra ou alcalina, é bastante útil na separação de substâncias que apresentam variações destas características. Ela separa bem hidrocarbonetos policíclicos, alcalóides, aminas e vitaminas liposolúveis.

Para se preparar cinco placas de 20 x 20 cm e espessura de 0,3 mm, recomenda-se a utilização de uma suspensão de 30 g de alumina em 40 mL de água destilada.

2.3. Terra Diatomácea

É um adsorvente neutro amplamente empregado como suporte nas separações por partição. Quando comparado com a sílica e alumina é menos adsorvente e com menor poder de resolução. Algumas vezes é adicionado à sílica para diminuir seu poder adsorvente. Pode ser encontrado comercialmente com ou sem aglutinante. Na preparação de placas utiliza-se as mesmas proporções citadas para a sílica, ou seja, uma parte de adsorvente para duas partes de água destilada.

2.4. Celulose

Tem sido empregada como suporte da fase estacionária líquida em cromatografia por partição ou troca iônica. Assim temos a celulose impregnada com polietilenoimina (PEI - celulose), empregada na separação de nucleotídeos e nucleosídeos; a carboximetil-celulose (CM- celulose) para a separação de proteínas; a dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) para a separação de proteínas e ácidos nucléicos, e uma mistura de celulose alcalina, trietanolamina e epicloridrina (ECTEOLA-celulose) para separação de proteínas e ácidos nucléicos. A celulose microcristalina pode ser empregada em todos os tipos de separações realizáveis por cromatografia em papel (Capítulo II), uma vez que exerce as mesmas funções, com as vantagens de ser de desenvolvimento mais rápido e de ter aumentada a sensibilidade do método. Neste caso tem sido empregada na separação de ácidos carboxílicos, aminoácidos, carboidratos, cátions inorgânicos e fosfatos.

Para a preparação de cinco placas de 20 x 20 cm, mistura-se 25 g de celulose com 90 mL de água destilada, agitando-se em agitador por dois minutos antes de colocar na placa de vidro.

2.5. Poliamida

A utilização de poliamidas vem crescendo nos últimos anos. Pode ser de dois tipos, de acordo com sua preparação. A poliamida 11 é preparada a partir do ácido poliaminoundecanóico (Nylon 11), enquanto que a poliamida 6 vem da aminopolicaprolactama (Perlon). Em geral, as separações ocorrem através da competição, pela formação de ligações tipo ponte de hidrogênio com o adsorvente, entre soluto e as fases. Tem sido empregada, com maior freqüência, na separação de fenóis e de ácidos carboxílicos. Sua maior utilização é comprometida pela dificuldade em se preparar as cromatoplacas no laboratório, em função de sua baixa aderência ao vidro.

Para a preparação das placas, recomenda-se fazer a suspensão de 15 g de pó em 60 mL de metanol, previamente purificado. Estas quantidades são suficientes para cinco placas de 20 x 20 cm e 0,3 mm de espessura.

2.6. Outros

Na literatura são encontradas referências a outros adsorventes orgânicos e inorgânicos, porém de utilização mais restrita. São os casos da uréia e polietileno para separar ácidos graxos; silicato de cálcio ou de magnésio para separar açúcares; gel de dextrana para separar aminoácidos e proteínas e carvão ativado para separar fenóis. De um modo geral, os adsorventes utilizados para separações por cromatografia em coluna podem também ser aplicados para camada delgada, evidentemente com diminuição do tamanho do grânulo e muitas vezes com a incorporação de aglutinante. Tem sido também muito utilizado o expediente de incorporar reagentes aos adsorventes, visando a separação de isômeros ou estruturas muito relacionadas. Uma das misturas mais utilizadas é a sílica com 3-30% de nitrato de prata (bons resultados são obtidos em média com 5-10%) para separar compostos insaturados, devido à formação de complexos entre o íon Ag^+ com duplas ligações. A incorporação do nitrato de prata pode ser feita através da substituição da água por solução aquosa do sal na preparação da suspensão ou através da pulverização das placas, já secas, com

solução de 10-20% de nitrato de prata em metanol aquoso. A adição de polietilenoglicol à terra diatomácea permite separar componentes da série homóloga dos ácidos dicarboxílicos. Na separação de carboidratos e compostos relacionados, tem sido utilizada a mistura de sílica e ácido bórico. Também são obtidas boas separações com a mistura de dois adsorventes, como a adição de celulose à sílica para separar antocianinas, ou poliamida à celulose para separar flavonóides.

3. TÉCNICAS GERAIS

3.1. Preparação de placas

3.1.1. Preparação por espalhamento

Existem diversas formas de se preparar uma placa cromatográfica, quer manualmente quer com emprego de espalhadores. Independente do método escolhido, a preparação sempre se inicia com a limpeza da placa de vidro, procurando-se eliminar toda a gordura de sua superfície. Para tanto, recomenda-se que a placa seja lavada com detergente, solução sulfocrômica e água corrente, evitando-se ao final enxaguar com solventes orgânicos, que possam conter gorduras que irão dificultar a aderência do adsorvente, e finalmente secando-se em estufa.

O tamanho da placa de vidro deve ser observado, pois os espalhadores em geral são construídos visando a utilização de placas com 20 cm de comprimento e largura variável. Quando a preparação for manual, este cuidado pode ser ignorado.

Quando não se dispõe de um aplicador, existem outras formas bastante simples de se preparar a placa. Uma delas consiste em preparar-se a suspensão do adsorvente no solvente adequado e, mantendo-se a placa de vidro na horizontal, transfere-se a suspensão para a superfície da placa, espalhando-a de maneira uniforme com auxílio de um bastão de vidro e oscilando-a para facilitar a uniformização da suspensão. Repousa-se a placa em uma superfície plana horizontal e deixa-se secar ao ar. A dificuldade encontrada neste processo é a obtenção de superfícies uniformes.

Um outro processo bastante simples, mais indicado para placas de pequenas dimensões, consiste na imersão da placa em uma suspensão do adsorvente, mantido em um frasco fechado de boca larga. Nestes casos, a suspensão é feita em um solvente orgânico volátil, como o clorofórmio, na proporção de 40 g de adsorvente para 100 ml de solvente. Toma-se duas placas com as faces justapostas e mergulha-se na suspensão, segurando-se com um pinça, e retira-se lentamente. As placas são separadas, o solvente evaporado ao ar e a camada de adsorvente exposta ao vapor d'água. Neste processo consegue-se superfícies bem mais delgadas e uniformes, o que permite a utilização de menores quantidades de amostras e desenvolvimento mais rápido dos cromatogramas. Placas assim preparadas têm seu uso restrito à escala analítica.

Uma vez aplicada a camada de adsorvente sobre a placa de vidro, ela é seca ao ar livre. Quando sua superfície ficar opaca, significa que ela está seca e conseqüentemente o adsorvente fixado no vidro. O tempo necessário para isto é variável. A título de exemplo, as placas de PEI-celulose necessitam 12 horas para secarem antes de ficarem prontas para uso, enquanto que as de poliamida ficam prontas em 30 minutos.

Quando se pretende preparar placas bem uniformes e com espessuras definidas, para uso analítico ou preparativo, se faz necessária a utilização de espalhadores. Eles são encontrados no mercado em tipos e

marcas diferentes, sendo os mais comuns os das marcas "Desaga", "Shandon" e "Camag". O seu funcionamento consiste fundamentalmente em manter as placas fixas em um suporte e sobre elas deslizar um recipiente contendo a suspensão do adsorvente. Enquanto o recipiente desliza, deixa escoar a suspensão, através de uma fenda regulável existente ao longo de sua base. A abertura da fenda varia segundo a origem do equipamento, entretanto, em geral estão dentro dos limites de 0 a 2,0 mm. Existem ainda espalhadores que mantêm o recipiente, com adsorvente, fixo e sob ele deslizam as placas fixadas em um suporte móvel. Estes modelos são de uso menos freqüente.

É possível que as lâminas de vidro não tenham a mesma espessura, o que provoca oscilação durante o deslizamento do recipiente ao passar de uma placa para outra. Para evitar este problema, alguns modelos de espalhadores permitem o nivelamento das placas, através de guias laterais que comprimem-nas contra um fundo provido de espuma de nylon, o que permite colocar todas as faces superiores das placas no mesmo nível.

Além dos espalhadores existentes no mercado, é mencionada na literatura a existência de diversos espalhadores adaptados ou construídos pelos pesquisadores em seus laboratórios.

3.1.2. Placas pré-fabricadas

Placas cromatográficas, pré-fabricadas, dos adsorventes mais utilizados estão disponíveis no mercado há algum tempo. Apesar de terem um custo bem mais elevado, dispensam a fase de preparação e são bem mais uniformes e homogêneas o que, sem dúvida, melhora a separação e torna os valores de R (fator de retenção, ver Capítulos I e II) mais reprodutíveis. A camada de adsorvente está depositada sobre uma lâmina de material plástico (por exemplo, ácido politeraftálico) ou de alumínio. São pré-cortadas, geralmente nos tamanhos 5 x 20 cm e 20 x 20 cm, e com a espessura da camada de adsorvente variando entre 0,1 a 2,0 mm. Também podem ser encontradas placas de 20 x 40 cm com 2,0 mm de espessura para fins preparativos.

Um dos cuidados que tem que ser observado na realização de uma cromatografia é a colocação das amostras exatamente na mesma linha de origem para não ocorrerem variações nos valores de R_f. Isto parece ter sido contornado com o lançamento de cromatoplacas com zona de concentração. São preparadas com dois componentes diferentes em camadas adjacentes, que apresentam uma bem definida linha divisória que não oferece resistência ao fluxo da fase móvel. A zona de concentração ocupa toda a extremidade inferior da placa, até uma altura de 2,5 cm no sentido do desenvolvimento do cromatograma, tem um comportamento inativo e apresenta boa velocidade de fluxo. O restante da placa é constituído do adsorvente propriamente dito. O produto lançado pela "Merck" consta de uma zona de concentração de dióxido de silício poroso sintético e o restante da placa de sílica gel 60.

3.2. Ativação das placas

Para muitas separações, as placas preparadas ou pré-fabricadas, secas ao ar livre, são usadas diretamente, enquanto outras separações exigem ativação das mesmas.

O tempo e a temperatura utilizados para a ativação estão na dependência do adsorvente utilizado e da atividade desejada. Temperaturas mais elevadas, por tempo prolongado, tornam a maioria dos adsorventes mais ativos. Sílica, alumina e terra diatomácea são ativadas a 105-110°C por 30 a 60 minutos. A celulose não deve ser aquecida por mais de 10 minutos a 105°C. As placas podem ser conservadas, prontas para uso, em ambientes secos como dessecadores ou caixas tipo estante fechadas.

3.3. Seleção da fase móvel

O solvente ou mistura de solventes a serem utilizados como fase móvel devem ser escolhidos cuidadosamente, pois terão papel fundamental na separação de misturas. Entende-se que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra, pela superfície do adsorvente. Portanto, na escolha da fase móvel temos que considerar a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel.

Nesta seleção, toma-se como base a "série eluotrópica" dos solventes, onde estes estão ordenados segundo as suas polaridades, as quais estão diretamente relacionadas com o poder de eluição. Esta série auxilia muito, porém deve-se ter em mente que não é raro encontrar-se alterações na mesma, em função do tipo de adsorvente ou da natureza das substâncias. O Apêndice 4 relaciona as fases móveis mais usuais, ordenadas segundo sua polaridade e com algumas de suas principais propriedades.

Quando uma fase móvel pura não separa bem os componentes de uma amostra, pode-se utilizar uma mistura. Podemos ter diferentes misturas que promovam igual separação das amostras, entretanto, no geral observa-se que pequenas variações na composição da fase móvel leva a grandes alterações no deslocamento das manchas.

Uma maneira bastante prática de se ter uma idéia do poder eluente da fase móvel consiste em colocar manchas da amostra sobre uma cromatoplaca e gotejar sobre cada uma delas, com auxílio de uma micropipeta, diferentes solventes. Serão observados deslocamentos concêntricos das substâncias, o que permitirá que, em poucos minutos, obtenha-se informação sobre a capacidade de deslocamento de diferentes solventes.

3.4. Aplicação das amostras nas cromatoplacas

As amostras são aplicadas nas cromatoplacas na forma de soluções, em solventes bastante voláteis, que possam ser facilmente eliminados após a aplicação. Em geral se empregam soluções de 0,1 a 1,0%, devendo sempre se ter em mente a sensibilidade do revelador, pois, se a amostra não for sensível ao mesmo, devemos aumentar sua concentração na placa. Soluções muito diluídas podem exigir a aplicação de um volume grande de amostra e, conseqüentemente, aumentar muito o diâmetro da mancha.

Para a aplicação da amostra podemos utilizar micropipetas ou microsseringas, que permitem determinar a quantidade de substância colocada na placa. Quando não é exigida a precisão na quantidade de amostra podem ser utilizados tubos capilares de vidro.

As gotas devem ser aplicadas 1,5 a 2,0 cm acima do bordo inferior, evitando-se que fiquem mergulhadas na fase móvel quando a placa for colocada na cuba. A distância entre cada gota é de aproximadamente 1,0cm, evitando-se sempre que haja contato entre as gotas de soluções.

Em placas preparativas, uma solução concentrada da amostra é aplicada na forma de faixa ou linha horizontal, cerca de 2,0 cm acima do bordo inferior da placa. A aplicação pode ser feita à mão, com auxílio de pipetas ou utilizando aplicadores automáticos de amostras, porém sempre de maneira rápida e bem uniforme. Se a amostra não estiver aplicada como uma faixa horizontal uniforme, as bandas das substâncias também não serão horizontais e o trabalho será perdido por má separação.

Nas placas preparativas, após o desenvolvimento e revelação do cromatograma, a faixa de substâncias desejada é retirada da placa com o auxílio de uma espátula ou aspirador apropriado e a substância extraída do adsorvente com um solvente adequado.

3.5. Revelação dos cromatogramas

Após o desenvolvimento do cromatograma, as placas são secas e reveladas. Esta última etapa consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. A visualização pode ser feita através de métodos físicos ou químicos, podendo também ser biológicos como no caso da utilização de reações enzimáticas ou bacterianas.

Muitos compostos podem ser visualizados através de luz ultravioleta por se tornarem fluorescentes quando excitados por essas radiações (em geral nos comprimentos de onda de 254 a 366 nm). Quando as substâncias não são fluorescentes pode-se utilizar adsorventes impregnados com reagentes fluorescentes e neste caso observamos manchas escuras contra fundo claro. Existem diversos tipos de lâmpadas ultravioletas portáteis que emitem radiações a 254 e 366 nm, combinadas no mesmo equipamento ou isoladas. As substâncias radioativas podem ser localizadas através de contador de radiações (tipo "Geiger") ou de auto-radiografia. Estes processos são enquadrados entre os métodos físicos e não-destrutivos e são especialmente indicados para cromatografias preparativas.

Muitos dos reativos empregados com agentes cromogênicos na cromatografia em papel podem também ser utilizados em CCD, sendo que em geral são bem mais sensíveis na segunda. É importante que a superfície do adsorvente seja borrifada uniformemente e para tanto existem diversos tipos de borrifadores, com forma e tamanho diferentes. A corrente de ar pode ser fornecida através de uma pêra de borracha ou através de ar comprimido, inclusive já são fornecidos atualmente frascos de reveladores acoplados a recipientes tipo aerosol (contendo diclorofluormetano comprimido). Recomenda-se que a borrifação seja feita em capela equipada com um exaustor eficiente.

Uma das vantagens da CCD sobre o papel é permitir a utilização de reveladores enérgicos ou que necessitam aquecimento posterior a borrifação (H_2SO_4, vanilina sulfúrica, tricloreto de antimônio, $KMnO_4/H_2SO_4$). Os adsorventes inorgânicos podem ser aquecidos a 100-120°C para ocorrer a reação cromogênica.

Para compostos orgânicos é muito utilizada a exposição da cromatoplaca aos vapores de iodo, em recipiente fechado. A maioria delas dá manchas marrons, tanto mais escuras quanto maior o tempo de exposição. A grande vantagem deste método é que o iodo pode ser posteriormente eliminado, na maioria dos casos, através do aquecimento da placa, a qual pode então ser borrifada com outro reativo. Isto é possível porque o iodo se une apenas fisicamente com as substâncias, exceto em compostos insaturados em que ele pode se adicionar às insaturações.

A literatura química traz uma série de referências a reativos de coloração para camada delgada, variando desde os de aplicação muito específica até as mais gerais, como no caso dos vapores de iodo. Algumas são indicadas na lista de referências do Capítulo II. Em geral, os métodos químicos de revelação são destrutivos e aplicáveis a separações analíticas. Em separações preparativas em que se faz necessária a utilização de revelador químico, cobre-se a cromatoplaca com vidro ou papelão, deixando-se exposta apenas uma tira em cada lateral e uma no centro (cerca de 0,5 cm) que são reveladas, e depois faz-se uma projeção para o resto da placa (como indica a *Figura II-2*, para cromatografia em papel).

3.6. Documentação

Os resultados obtidos através de uma separação por cromatografia em camada delgada podem ser observados de diferentes formas, seja desenhando as placas, seja delineando a placa sobre o papel de seda transparente colocado sobre o adsorvente ou então através de processos mais sofisticados.

As cromatoplacas podem ser fotografadas após a revelação por métodos físicos ou químicos. Quando a revelação persistir por algum tempo, caso da revelação química, pode-se tornar o adsorvente translúcido por tratamento com vaselina líquida e fotocopiar a cromatoplaca em máquinas tipo xerox. Quando as cores das manchas forem bem fortes e nítidas não é necessário o tratamento com vaselina líquida.

Em alguns casos, a camada de adsorvente pode ser retirada pela formação de uma película plástica flexível sobre a superfície. Isto é possível quando se borrifa a camada de adsorvente com reativos especiais, como o "Neatan" (propionato de polivinila) fornecido pela "Merck".

4. FORMAS DE DESENVOLVIMENTO

Existem algumas formas diferentes de desenvolvimento de um cromatograma, utilizadas sempre objetivando uma melhor separação de componentes da amostra.

Cromatografia ascendente é o método mais utilizado e pode ser considerado como a técnica básica. Geralmente se inicia um trabalho com o desenvolvimento unidimensional ascendente, com fase móvel e adsorvente puro. Caso não se tenha bons resultados, parte-se para modificações. As cubas cromatográficas, em geral de vidro, com fundo plano, devem ter junto às paredes um pedaço de papel de filtro que permita que a fase móvel suba por ele e sature bem rapidamente o interior das mesmas. A fase móvel deve cobrir todo o fundo da cuba, até uma altura que seja inferior àquela das manchas nas placas (em geral 0,5-1,0 cm). As placas são colocadas na cuba cromatográfica quase na posição vertical, apoiadas no fundo da cuba e inclinadas para as paredes laterais. Podem ser colocadas mais de uma placa em uma cuba, entretanto deve-se tomar cuidado que entre elas exista um espaço não muito estreito, para que a fase móvel não suba entre elas por capilaridade. Isto se consegue com auxílio de bastões de vidro ou pedaços de teflon. Algumas cubas retangulares existentes no mercado já tem, nas paredes laterais menores, sulcos para o encaixe das placas, permitindo desta forma o desenvolvimento de várias ao mesmo tempo. Tão logo a fase móvel atinja a parte superior das placas, estas são retiradas e secas rapidamente ao ar livre ou com secador de cabelos. Não se deve esquecer de marcar a distância percorrida pela fase móvel, a fim de permitir o cálculo dos valores de R_f

Além do desenvolvimento unidimensional, pode-se utilizar também o bidimensional, semelhante ao observado para a cromatografia em papel (*Figura II-1*). Para tanto, a amostra é colocada em um ângulo da placa e o cromatograma desenvolvido em um sentido. A placa é retirada, seca e, após um giro de 90°, é desenvolvida em um segundo sentido, utilizando-se uma fase móvel diferente.

Pode-se utilizar ainda a cromatografia ascendente unidimensional com múltiplo desenvolvimento. Uma vez desenvolvido o cromatograma, a placa é retirada da cuba, seca e retorna para novo desenvolvimento. Utiliza-se em geral a mesma fase móvel e uma placa pode sofrer sucessivos desenvolvimentos, até que se consiga uma boa separação. Este procedimento pode ser encarado como um aumento da camada de adsorvente, no sentido de desenvolvimento do cromatograma.

Outra técnica que leva a boas separações, apesar de pouco utilizada, é o desenvolvimento horizontal. As placas ficam apoiadas na posição horizontal e as amostras se destacam em linha reta. Quando as placas são retangulares, a fase móvel é colocada em uma das extremidades; quando são circulares, a amostra fica em um círculo ao redor do centro e neste se aplica a fase móvel. As manchas aparecem em círculos concêntricos.

O desenvolvimento de um equipamento relativamente simples, mas muito eficiente, o "Chromatotron", promoveu um grande interesse pela CCD centrífuga. Trata-se de uma CCD com desenvolvimento circular, em um disco de 24 cm de diâmetro, com uma camada de adsorvente de espessura variável de 1 a 4 mm. O processo cromatográfico se desenvolve do centro para as bordas, estando o disco na câmara cromatográfica submetido a um movimento circular de velocidade controlada. Sua grande vantagem reside na possibilidade de rápidas separações preparativas de amostras com quantidades variáveis de 0,1 a 1,0 g.

A literatura faz ainda referências a outros tipos de desenvolvimentos, que não serão aqui discutidos, como desenvolvimento gradual, contínuo, em suportes cuneiformes, com gradiente de adsorvente, com gradiente de fase móvel e desenvolvimento anti-circular.

5. ANÁLISE QUANTITATIVA

A CCD pode ser utilizada como um método quantitativo de análise, diretamente sobre a camada de adsorvente ou retirando da placa a área que contenha a substância, que é então eluída e quantificada.

Um dos métodos freqüentemente utilizados é a densitometria, que consiste em determinar a área e a intensidade da mancha. Tem como inconveniente o fato de compostos incolores, ao serem revelados, apresentarem distribuição desigual da mancha, em função da quantidade de revelador utilizado, aquecimento ou volatização da amostra.

Outros métodos de emprego direto são a medida de fluorescência e radioatividade, para substâncias que apresentarem estas características. As dosagens são feitas através de comparação com padrões (ver Capítulo II).

6. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

Como mencionado no item 5, a CCD pode ser utilizada em análise quantitativa, porém tradicionalmente é um método simples, rápido e econômico de análise qualitativa. Entretanto nos últimos anos vem adquirindo aplicações mais definidas em análise quantitativa. Esta alteração nas características se deve ao desenvolvimento na qualidade dos adsorventes, na forma de aplicação da amostra e nos densitômetros, permitindo análise quantitativa "in situ". Este aumento na eficiência, em relação a CCD usual, levou ao aparecimento da CCDAE, denominação emanada da similaridade com a CLAE, visto as duas técnicas serem muito semelhantes quanto ao fenômeno físico que as rege, diferindo fundamentalmente no aspecto prático.

Na *Tabela III-1* é apresentada uma comparação entre CCD e CCDAE. A análise desta tabela permite verificar que, comparativamente, a CCDAE é uma técnica mais rápida, eficiente e sensível que a CCD

convencional, podendo ser dito que trata-se de um aperfeiçoamento da mesma e com aplicação indicada quando se pretende análise quantitativa. Para uma abordagem detalhada desta técnica, são sugeridas as referências ZLATKIS e KAISER, e POOLE e SCHUETTE, além de outras nelas mencionadas.

Tabela III-1

Comparação entre cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)

Parâmetro	CCD	CCDAE
Tamanho usual da placa	20 x 20 cm	10 x 10 cm
Volume aplicado de cada amostra	1-5 μL	0,1-0,2 μL
Número de amostras por placa	7-10	10-20
Diâmetro da mancha	3-6 mm	1 mm
Distância de migração do solvente	10-15 cm	3-6 cm
Tempo de corrida	30-200 min	3-20 min
Diâmetro médio da partícula de sílica gel	20 μm	5 μ
Limites de detecção		
por absorção de luz	~ 5 ng	~ 0,5 ng
por fluorescência	~ 0,1 ng	~ 0,01 ng
Pratos teóricos	até 600	até 5000

7. APLICAÇÕES DA CCD

A CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. Ela tem demonstrado ser de valor extraordinário na análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, acompanhamento de reações em sínteses e de processos de purificações. Seria muito difícil relacionar todas as aplicações da CCD; mais fácil seria citar que ela está presente em quase todos os laboratórios de química ou biologia, face a fatos como a existência de diferentes fases móveis e estacionárias, diferentes técnicas de desenvolvimento e visualização, a sua rápida execução, a sua reprodutibilidade e ao seu custo não elevado.

8. REFERÊNCIAS

- FENIMORE, D.C. e DAVIS, C.M. *Anal. Chem.* 53, 252A, 1981.
- HEFTMANN, E. *Chromatography*, Van Nostrand-Reinhold, New York, 1967.
- MIKES, O., ed. *Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1979.

- STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography - A Laboratory Handbook*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1969.
- STHAL, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 22*, 507, 1983.
- POOLE, C.F. e SCHUETTE, S.A., *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- TOUCHSTONE, J.C. e DOBBINS, M.F. *Practice of Thin-Layer Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1978.
- ZLATKIS, A. e KAISER, R.E. *HPTLC-High Performance Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1977.

CAPÍTULO IV

CROMATOGRAFIA POR ADSORÇÃO

Walter Vichenewski
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

Os métodos cromatográficos líquido-sólido (adsorção), líquido-líquido (partição) e troca iônica podem ser realizados numa coluna recheada. A cromatografia por troca iônica será abordada no Capítulo V e a cromatografia em coluna sob pressão nos Capítulos VII (fase móvel gasosa) e VIII (fase móvel líquida). Neste capítulo consideraremos a cromatografia na qual se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária. Empiricamente esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples, não exigindo instrumentação esmerada. Dependendo do tamanho da coluna usada, é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorizada, principalmente, por cromatografia em camada delgada.

2. A COLUNA

De uma maneira geral, a coluna cromatográfica é constituída por um tubo de vidro, em posição vertical; a extremidade superior é aberta e a inferior é afilada terminando numa torneira, que permitirá o controle da vazão da fase móvel.

As dimensões da coluna dependerão da quantidade de material a ser cromatografado. Por exemplo, se a quantidade de material for pequena, até uma bureta pode ser usada para construir a coluna.

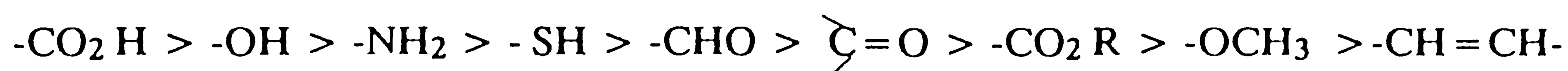
Na parte superior da coluna se adapta um recipiente como reservatório da fase móvel e abaixo da torneira se colocam recipientes ou frascos coletores do eluente, cujas dimensões dependem do volume de cada fração a ser coletada.

A fase que fica no interior da coluna (adsorvente) é suportada, na parte inferior, por um chumaço de lã de vidro, como mostra a *Figura IV-1*, ou por uma placa porosa de vidro ou teflon.

3. OS PROCESSOS DE ADSORÇÃO EM COLUNA

Para se conhecer a natureza do processo de adsorção deve-se considerar a atividade do adsorvente (atividade cromatográfica) que, de uma maneira geral, traduz a força de adsorção. Porém, às vezes, pode significar a área de superfície ativa do sólido, onde ocorre a adsorção. As substâncias eluirão da coluna segundo a sua polaridade.

A atividade cromatográfica do sólido (fase estacionária), tendo grupos polares, aumenta sobre substâncias polares, observando-se a ordem:

$$-CO_2H > -OH > -NH_2 > -SH > -CHO > \rangle C=O > -CO_2R > -OCH_3 > -CH=CH-$$

Deve-se evitar que o movimento da substância adsorvida na coluna seja lento e que a banda se torne larga com baixa concentração e com tendência de se envolver com outras bandas. No caso de alumina, quando se utiliza eluição por gradiente e/ou eluição em etapas, pode-se evitar aqueles inconvenientes fazendo a sua desativação pelo aquecimento a altas temperaturas (700 a 800°C) ou umidecer a alumina com água. Tanto num caso como no outro, o objetivo é impedir a ação das partes mais ativas ou obstruir os poros finos do adsorvente, que provoca uma tendência para o endireitamento da isoterma pela redução da superfície específica. Estas observações são também válidas para os outros adsorventes (*Tabela IV-1*).

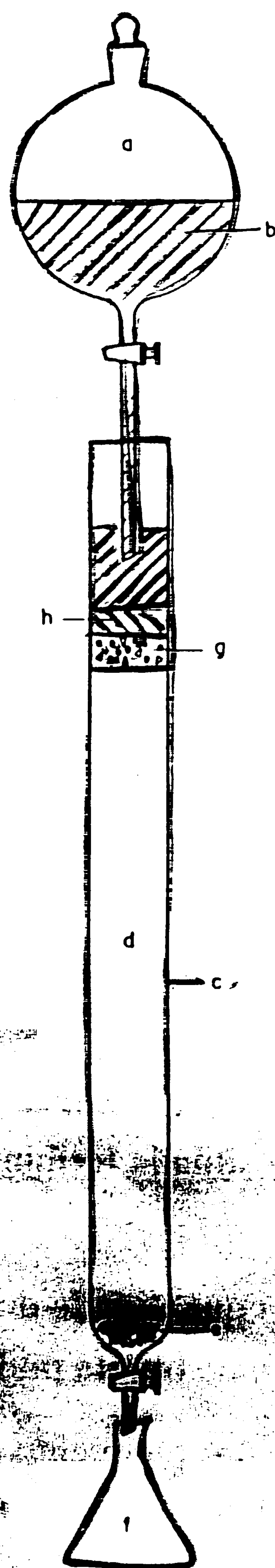



FIGURA IV-1 Esquema de uma coluna de adsorção.
a: reservatório; b: fase móvel; c: coluna de vidro; d: adsorvente; e: chumaço de lã de vidro; f: frasco coletor; g: amostra; h: camada de areia ou de recheio, colocada após a aplicação da amostra.

4. PREPARAÇÃO DOS ADSORVENTES

Para ativação dos adsorventes (alumina, sílica gel, silicato de magnésio, carvão ativo), eles são aquecidos para dessorção de água e de outros materiais adsorvidos.

Para alumina, uma ótima temperatura para ativação é aproximadamente 400°C durante quatro horas; um período de aquecimento mais prolongado poderá causar a perda de atividade. Para os outros sólidos, um aquecimento ao redor de 200°C durante duas horas é suficiente.

A atividade está relacionada com a quantidade de água adsorvida e é determinada em função de sua capacidade de adsorver uma série de corantes que são: azobenzeno, p-metoxiazobenzeno, amarelo Sudan, vermelho Sudan, p-aminoazobenzeno e p-hidroxiazobenzeno. Uma alumina de atividade I adsorveria mais o p-metoxiazobenzeno do que o azobenzeno.

A alumina com atividade grau I é a mais usada em cromatografia em coluna e é a mais ativa, pois foi aquecida a 400°C por quatro horas, ou até não ocorrer mais dessorção de água. Aquela com grau II tem 2-3% de água, adicionada a de grau I, a de grau III tem 5-7%, de grau IV 9- 11% e a de grau V, que é a menos ativa, tem 15%. A mistura de partes iguais de alumina de atividade I e III, deixada durante 12 horas, passa a ter atividade II.

A cromatografia em coluna tem a desvantagem de produzir cauda (efeito de difusão) e, além disso, não apresenta separações totalmente reprodutíveis em virtude do adsorvente de mesmo lote poder ter suas atividades variadas. A reprodutibilidade pode ser aumentada usando um tamanho de partícula adequado; por exemplo, não se usaria um tamanho tão pequeno que impediria o fluxo da fase móvel. A quantidade de adsorvente a ser usada varia de acordo com a adsorbilidade do material; geralmente, a proporção mínima de adsorvente/substância é de 25:1.

Tabela IV-1

Fases estacionárias para cromatografia em coluna.

Adsorvente	Atividade*	Tamanho da partícula⁺ malha	µm
Óxido de alumínio básico	I	70-230	63-200
Óxido de alumínio neutro	I	70-230	63-200
Óxido de alumínio ácido	I	70-230	63-200
Óxido de alumínio neutro	II e III	70-230	63-200
Celulose microcristalina	-	70-230	63-200
Silicato de magnésio (MgO/Si = 15:85)	-	100-200	75-150
Sílica gel (ácido silícico)	II e III	70-230	63-200

* Atividade na escala Brockmann
+ Especificação da American Society for Testing and Materials, ver Apêndice 5.

5. REAÇÕES NA COLUNA

Os sólidos usados nas colunas cromatográficas às vezes tornam-se catalizadores de reações. Este problema é maior com alumina do que com sílica. Por exemplo, a alumina alcalina pode causar a condensação de aldeídos e cetonas; neste caso se usaria uma alumina neutra. A acetona não é usada como fase móvel quando se utiliza alumina. O carvão ativo pode levar à decomposição química, e a sílica pode causar a isomerização de terpenos e esteróides.

6. ESCOLHA DE ELUENTES

A função das fases móveis na cromatografia por adsorção tem sentido amplo: a) Realizar a sua função de solvente, propriamente dito, no que deve ser levado em consideração as relações de solubilidade dos componentes da mistura a ser cromatografada. As fases móveis devem ter baixo ponto de ebulição (35 - 85°C) para que sejam evaporados facilmente. b) Realizar, primordialmente, o desenvolvimento dos componentes da mistura na coluna e remover ou dessorver estes componentes do adsorvente. Neste caso, são ditos eluentes.

As observações da monitorização por cromatografia em camada delgada devem orientar na escolha dos eluentes e do recheio da coluna. Após ter sido escolhido o adsorvente, os eluentes são selecionados de acordo com seu poder eluente; isto é, num aumento de habilidade de dessorver do adsorvente as substâncias (adsorvato) fixadas no mesmo. Geralmente, a dessorção é facilitada quando se usa um eluente polar e dificultada pelo uso daquele de polaridade menor; isto é, um adsorvato estará mais fixado no adsorvente quando o eluente em uso é pouco polar. Porém, o deslocamento do adsorvato é lento. Para o desenvolvimento do mesmo tornar-se mais rápido deve-se usar um outro eluente mais polar. Desta maneira, deve-se seguir uma série gradual de eluentes, como se observa na *Tabela IV-2.*

Tabela IV-2

Série de eluentes, em ordem crescente de polaridade *
Hexano
Éter de Petróleo
Ciclohexano
Tetracloreto de Carbono
Benzeno
Tolueno
Diclorometano
Clorofórmio
Éter Etílico
Acetato de Etila
Piridina
Acetona
Etanol
Metanol
Ácido Acético

* de ponto de ebulição baixo

Desta série de eluentes deve-se escolher aquele (ou aqueles) que consegue(m) dessorver o adsorvato. Por exemplo, uma série de eluentes pode ser: éter de petróleo, éter de petróleo e benzeno (1:6), éter de petróleo e benzeno (1:3) e assim por diante. É preferível não utilizar a acetona, pois pode ocorrer a formação de produtos de condensação após contacto com o adsorvente. A polaridade desta série gradual de eluentes está relacioanda com as experiências práticas de cromatografia em coluna. A vazão do eluente pode ser aproximadamente de uma gota por segundo. Não se deve aumentar muito rapidamente a polaridade do eluente para se evitar a sobreposição de bandas.

7. ENCHIMENTO DA COLUNA

Quanto mais uniforme for o enchimento da coluna, maior será a sua eficiência. Durante o enchimento o ar pode ficar retido entre as partículas, o que não é conveniente, pois formaria canais na coluna que prejudicariam (alargando) as bandas em eluição. Para se evitar a retenção de ar o adsorvente deve ser agitado num frasco, com a fase móvel, até a constituição de uma pasta, a qual será então colocada dentro da coluna, já contendo 1/3 da fase móvel. Nesta operação acompanhada por vibração da coluna e, deixando o material assentar gradualmente, obtém-se uma razoável homogeneidade no enchimento. Se existir uma uniformidade no tamanho das partículas, melhor será a homogeneidade do recheio. Deve-se evitar deixar a coluna secar durante o enchimento ou durante a eluição, porque aparecem rachaduras na coluna, com o que a separação cromatográfica ficaria altamente prejudicada.

Uma vez montada a coluna cromatográfica, a amostra deve ser colocada no topo da mesma. Isto é feito colocando ou amostra sólida solubilizada num volume mínimo de solvente, ou amostra líquida, ou extrato, por meio de uma pipeta, na superfície do adsorvente. As amostras, tanto sólida ou líquida podem ser misturadas com o adsorvente e, após evaporar o solvente, a mistura é colocada no topo da coluna. O eluente deve estar ultrapassando aquela superfície, formando uma camada de 2-3 cm de espessura. Após toda amostra ter sido colocada é adicionada a fase móvel, cuidadosamente, até que se forme uma coluna líquida incolor e límpida acima do nível superior da amostra. Para manter esta superfície da amostra uniforme, é conveniente colocar, antes de adicionar a primeira fase móvel, uma camada de areia ou do próprio recheio (1 a 2 cm de espessura) sobre ela para evitar anormalidades quando da adição das fases móveis.

8. A ELUIÇÃO

Uma coluna cromatográfica pode ser fixada em qualquer posição no espaço, porém a mais conveniente é fixá-la em posição vertical. Assim a eluição se processará por ação da gravidade, não sendo necessário o uso de pressão, como em outras posições. Além disso, a posição vertical evita a formação de canais. Geralmente, a eluição é em etapas, com modificação gradual das fases móveis.

A *Figura IV-2* mostra uma típica adsorção isotérmica. Nas *Figuras IV-3a* e IV-*3b* observam-se as características de uma banda cromatográfica, isto é, quanto maior a distância percorrida pelo material eluído, maior é a sua distribuição dentro da coluna, formando uma banda que mostra uma parte caudal e parte frontal, num determinado estágio de sua passagem descendente.

QUANTIDADE DE ADSORVATO NA FASE ESTACIONÁRIA

QUANTIDADE NA FASE MÓVEL

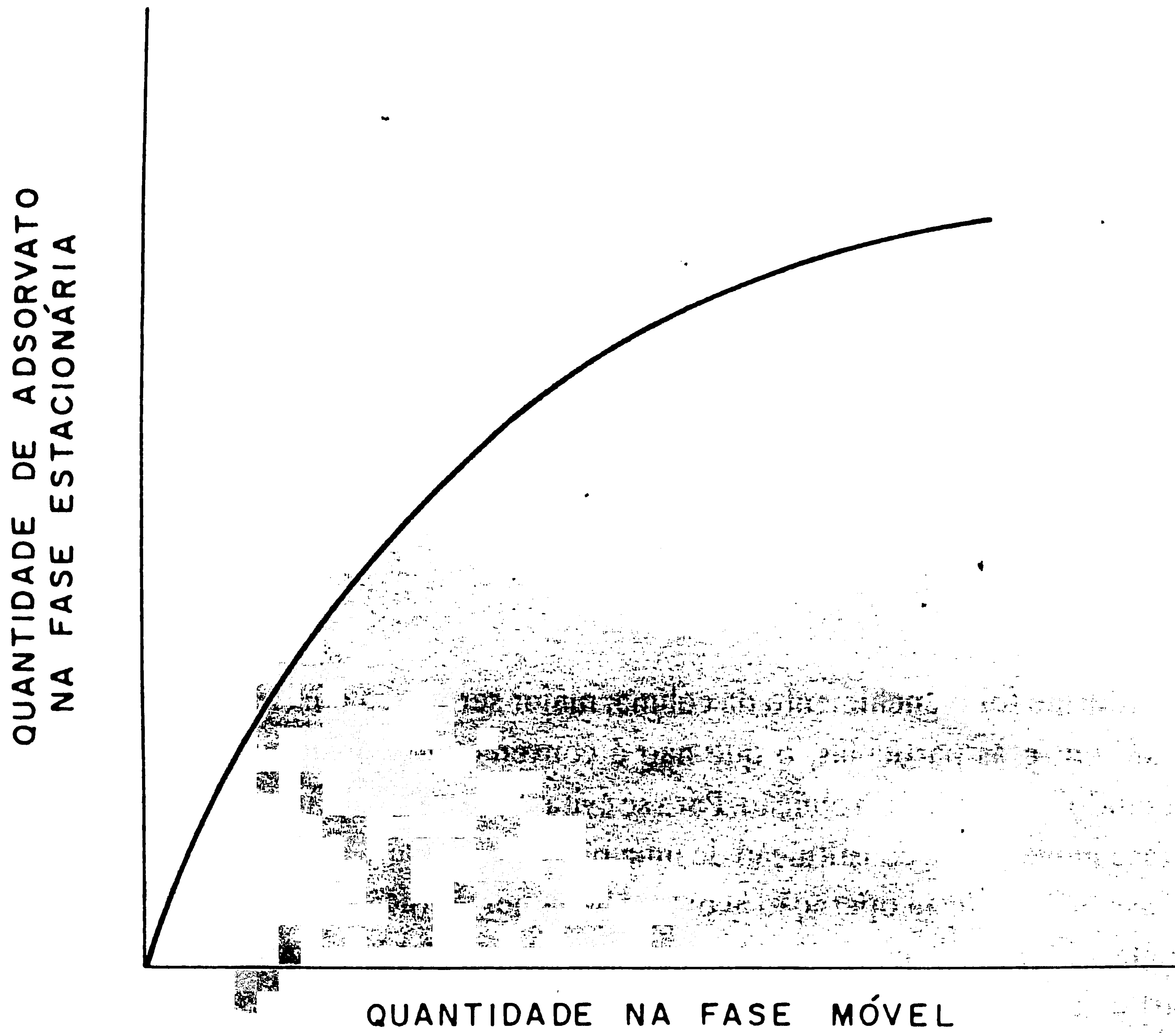



FIGURA IV-2 Curva de adsorção isotérmica.

a

b

CONCENTRAÇÃO DE ADSORVATO NA FASE ESTACIONÁRIA

DISTÂNCIA PERCORRIDA

CAUDA

PARTE FRONTAL

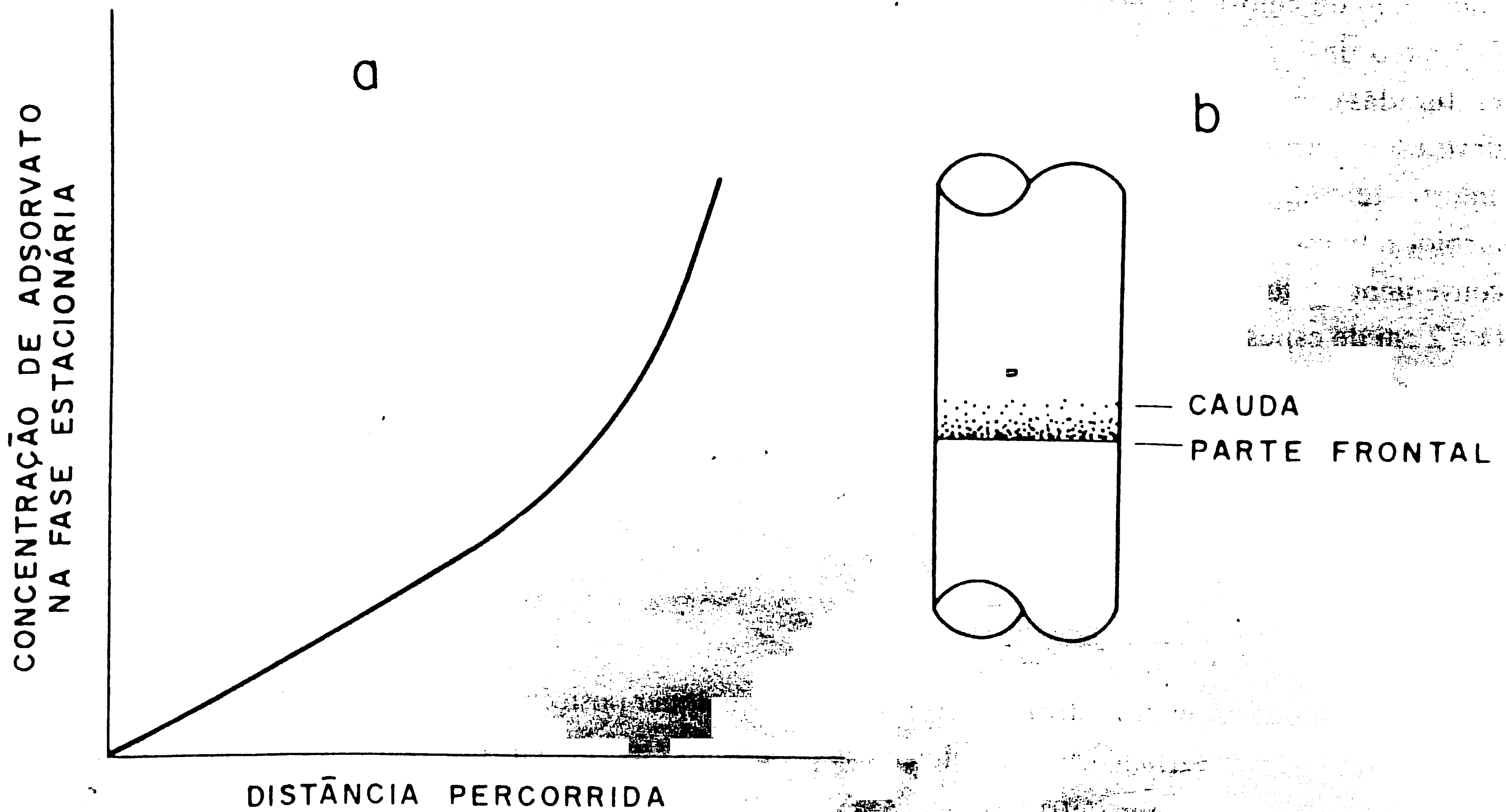



FIGURA IV-3 Adsorção ideal de um soluto na fase estacionária.
a: a concentração do adsorvato na fase estacionária em função da distância percorrida; b: banda dentro da coluna cromatográfica.

Se ocorrer um fenômeno como mostra a *Figura IV-4*, a banda cromatográfica terá uma cauda difusa e longa, o que tornará este método cromatográfico em coluna de adsorção desvantajoso porque envolveria a banda adjacente.

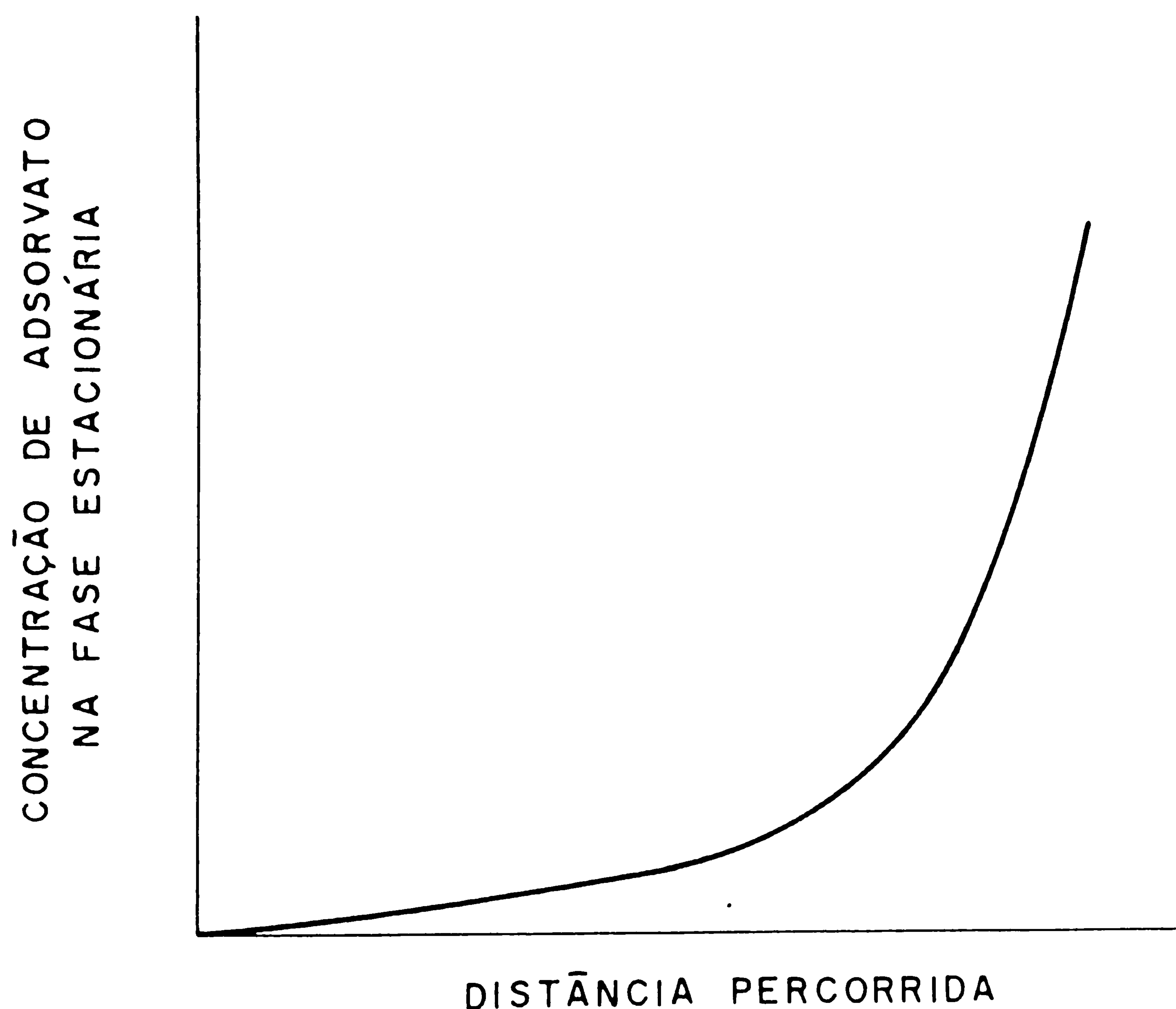



FIGURA IV-4 Adsorção não ideal de um soluto na fase estacionária.

A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápida é a sua passagem pela coluna, e vice-versa. Conclui-se, portanto, que quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza), como se observa na *Figura IV-5*. Esta separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de van der Waals) entre eles e o adsorvente. Na cromatografia por troca iônica estas forças são do tipo iônica, como será visto no Capítulo V.

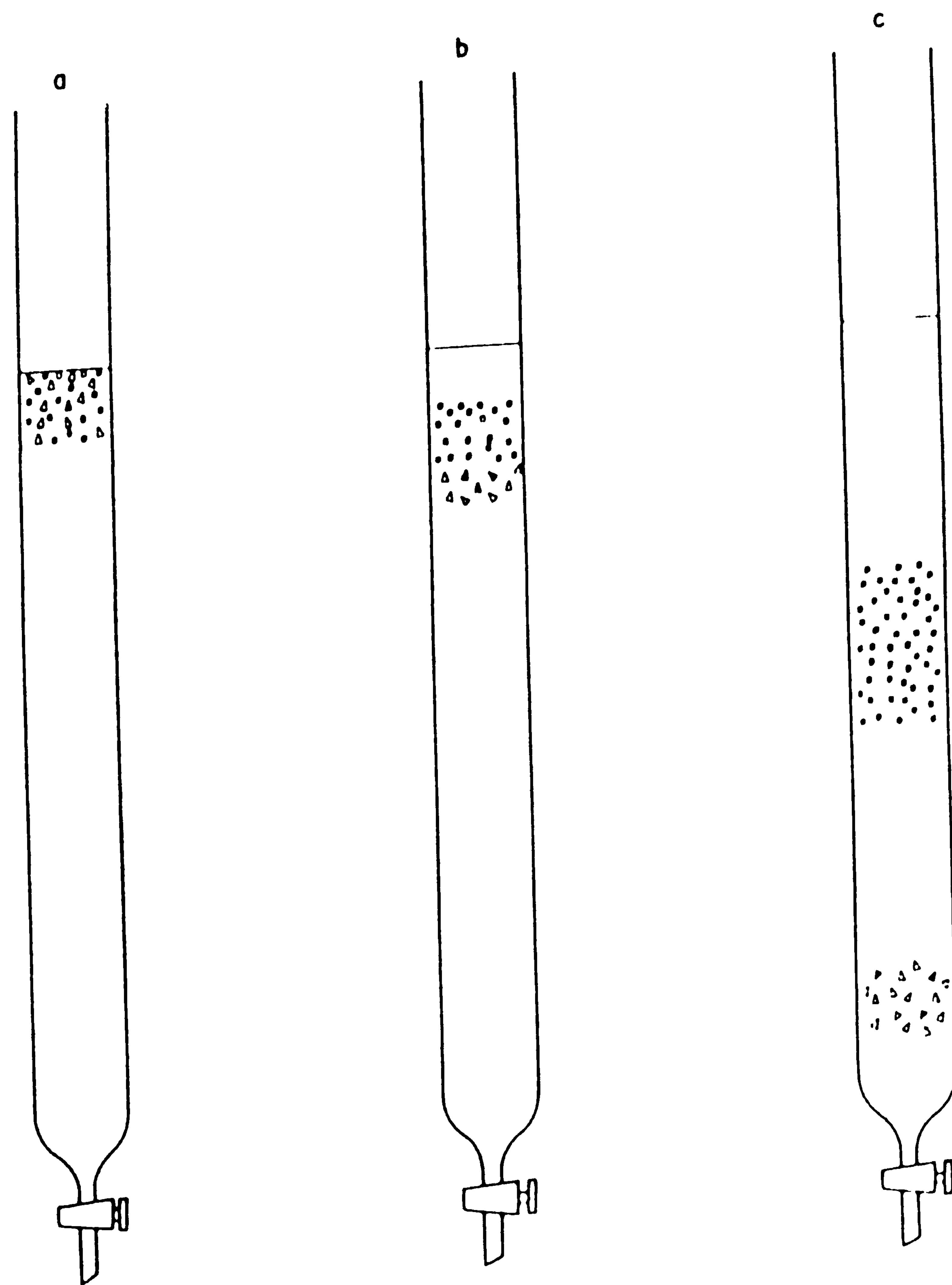



FIGURA IV-5 Eluição de três compostos em mistura.
a: mistura no topo da coluna; b: início da separação; c: separação completa de um dos componentes.

Para ocorrer uma completa separação a fase móvel deve:

a. Ser fracamente adsorvida pela fase estacionária;

b. Não ser afetada quimicamente;

c. Possibilitar realmente o desenvolvimento de uma corrida cromatográfica, ocasionado por um determinado grau de adsorção.

9. CROMATOGRAFIA EM COLUNA SECA

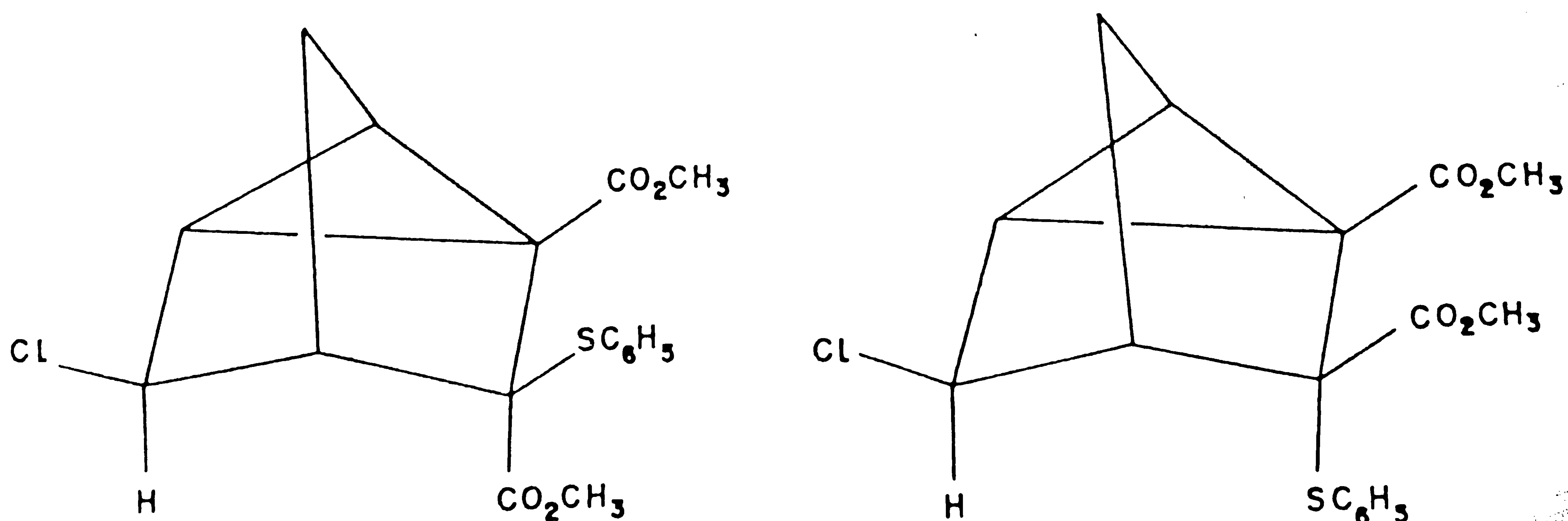
Em determinadas situações para a separação e purificação dos componentes de uma amostra, pode-se usar uma variação da tradicional técnica de cromatografia em coluna úmida. Trata-se da cromatografia em coluna seca que apresenta uma melhor resolução e uma redução de tempo e de volume de solventes durante a eluição da amostra. A coluna é preparada usando o adsorvente seco e, freqüentemente, contendo um indicador fluorescente. O adsorvente deve ser colocado num tubo de vidro ou um tubo de náilon maleável, ou de outro material flexível, resistente e inerte aos solventes a serem usados e que seja transparente à luz ultravioleta.

Na montagem da coluna em tubo de material maleável, deve-se fechar a extremidade inferior à quente ou por grampeamento e se faz dois ou três furos para evitar formação de bolhas de ar quando do enchimento. A compactação é feita deixando-se cair no tubo um terço da quantidade total do adsorvente, de cada vez, de uma altura de 20 cm, por duas ou três vezes. A coluna torna-se rígida podendo ser segura por garras.

A amostra, preparada como foi descrito anteriormente, é colocada no topo da coluna de adsorvente. Em seguida, acrescenta-se a fase móvel até que sua linha de frente atinja a base da coluna (pode-se deixar fluir algumas gotas, se necessário).

A escolha da fase móvel e as dimensões da coluna estão na dependência dos resultados da análise da amostra por cromatografia em camada delgada, cujo adsorvente contém indicador fluorescente. A coluna, após desenvolvimento, é exposta à luz ultravioleta e se faz delimitações das faixas, contendo os adsorvatos separados, as quais são cortadas, usando uma lâmina afiada. As fatias deverão ser cortadas com cautela, e em seguida eluídas com solventes apropriados (éter etílico, clorofórmio, metanol, etc.). No caso de ter sido usado tubo de vidro, este deve ser invertido e abrindo-se a torneira o recheio se desliga. A aplicação de pressão, ligando uma bomba compressora na extremidade do tubo onde se encontra a torneira, também faz com que o recheio se desligue. A seguir separam-se as faixas que foram delimitadas com a luz ultravioleta.

Para se ter uma separação ideal é conveniente usar um único solvente como eluidor, da mesma maneira como ocorre na cromatografia em camada delgada. Em caso de se usar um eluidor misto, o adsorvente deverá ser umidecido com o mesmo, depois seco e, em seguida, usado no enchimento. A proporção do adsorvente e amostra, enquanto na coluna úmida é de 30:1, nesta técnica é de 70:1 em caso de uma separação média e em caso de uma separação difícil é de 300:1. Pode-se usar até 50 g da amostra numa coluna seca de 2 m de altura.

Com esta técnica pode-se separar até enantiômeros tais como:

10. USO DA CROMATOGRAFIA POR ADSORÇÃO

São várias as áreas de pesquisas nas quais este tipo de cromatografia é utilizada, como por exemplo:

a. Em laboratórios de química orgânica para separar e purificar reagentes e materiais obtidos por sínteses;

b. Em laboratórios de produtos naturais, os quais são normalmente submetidos a este método cromatográfico em escala preparativa e analítica;

c) Em laboratórios de análises clínicas para separar esteróides de urina ou de sangue, etc.

11. REFERÊNCIAS

- BROWNING, D.R. *Cromatografia*, Toray-Masson, S.A., Barcelona, 1971.
- HEFTMANN, E. *Chromatography*, 2ª edição, Reinhold, New York, 1967.
- SHRINER, R.L.; FUSON, R.C.; CURTIN, D.Y. e MORRIL, T.C. *Identificação Sistemática dos Compostos Orgânicos: Manual de Laboratório*, 6ª edição, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1983.

CAPÍTULO V

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

Augusto Cesar C. Spadaro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

As primeiras observações registradas na leitura, referentes à troca iônica, foram feitas por WAY e por THOMPSON em 1850. Estes químicos, especializados em solos, descobriram, nas primeiras décadas deste século, a capacidade destes em remover íons NH_4^+ de soluções que os atravessavam, substituindo-os por uma quantidade equivalente de íons Ca2+ . A partir destas observações, várias tentativas foram realizadas no sentido de produzir trocadores inorgânicos mais apropriados. As principais dificuldades encontradas eram principalmente quanto ao acesso da substância a ser trocada no material utilizado como suporte, refletindo em uma baixa capacidade de troca e dificuldades na regeneração deste, para ser novamente utilizado. Os trabalhos de GANS evidenciaram estas tentativas. Utilizando proporções moleculares de $1Al_2O_3 : 1OSiO_2$ ele obteve um produto que não se dissolvia na água e era resistente à desintegração.

Apesar das dificuldades encontradas, a recompensa destes esforços foi obtida com a utilização do processo de troca iônica para suavizar a dureza da água, denominação dada à água que é rica em cátions como Ca^{2+} , Pb^{2+} e Mg^{2+} .

Em 1917, a literatura registra uma das primeiras tentativas do emprego da troca iônica para resolver problemas analíticos de investigação bioquímica, descrevendo a utilização deste método para a determinação do teor de amônio na urina, em trabalho desenvolvido por FOLIN e BELL.

Por volta de 1935, começaram a ser produzidas resinas de troca iônica orgânicas, muito mais eficientes, passando a constituir um meio químico de extraordinário valor em processos analíticos.

Os trabalhos desenvolvidos pelos pesquisadores do Projeto Plutônio da Comissão de Energia Atômica nos Estados Unidos promoveram grandes avanços na separação de ânions e cátions por troca iônica, que despertaram a atenção de pesquisadores de outras áreas para este processo cromatográfico.

Os trabalhos pioneiros de MOORE e STEIN na separação de aminoácidos, de FRUTON na separação de peptídeos e de COLIN e col. na separação de ácidos nucléicos e derivados mostraram o valor do método no campo bioquímico, tendo iniciado uma era nesta área.

2. O MECANISMO DE CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

Na cromatografia por troca iônica a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subseqüentemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem este tipo de cromatografia. A separação de materiais por cromatografia por troca iônica está baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devido a diferenças de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como o pH e a força iônica.

O mecanismo da ação de um trocador iônico está resumido na *Figura V-1*. O trocador catiônico, neste caso, está em equilíbrio com o eluente inical contendo os íons X^+ (a). B^+ e C^{2+} são materiais a serem separados. Quando determinada quantidade de tais amostras são colocadas com o trocador ocorre a adsorção, liberando quantidade equivalente dos íons X^+ , anteriormente ligados à matriz (b). Após a adsorção é aplicado um eluente, que contém íons Z^+ com uma afinidade pouco maior pelos grupos trocadores da matriz. Estes íons vão provocar a liberação da substância B^+, ligada mais fracamente à matriz que a substância C^{2+} (c). Passando a seguir o segundo eluente, contendo os íons W^+ com maior afinidade ainda pela matriz, haverá a liberação do material C^{2+} , e assim, a separação dos materiais B^+ e C^{2+} (d). O efeito dos íons de maior afinidade relativa a X^+ , isto é, Z^+ e W^+ , pode também ser conseguido por concentrações crescentes deste, alterando o equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária.

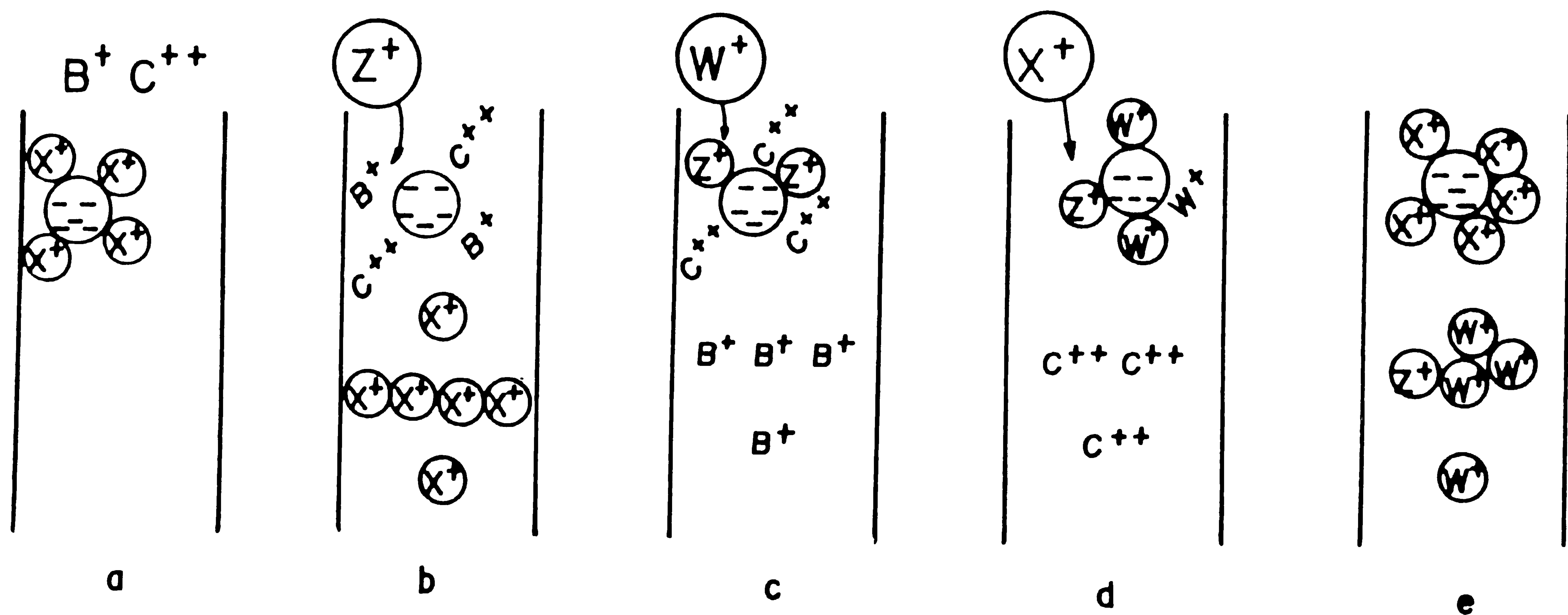



FIGURA V-1 Esquema do mecanismo de troca iônica.
B^+ e C^{2+} são materiais a serem separados. X^+, Z^+ e W^+ são íons contidos nos eluentes 1, 2 e 3, respectivamente.

Para que a coluna possa ser novamente utilizada, ela precisa ser regenerada, isto é, ser equilibrada com o eluente inicial. Neste caso, os íons do eluente têm uma menor afinidade pelo grupo trocador da matriz, mas a condição de equilíbrio é alcançada fazendo-se passar pela coluna um volume do eluente igual a 5-10

vezes a sua capacidade. Deste modo, é possível ocorrer a troca de íons, eliminando aqueles contidos nos eluentes anteriormente utilizados. Sendo assim, o grau de afinidade é superado pela maior concentração de íons (e).

Um perfil de eluição hipotético, referente a situação representada neste esquema, pode ser visualizado na *Figura V-2*.

MEDIDA RELATIVA DAS SUBSTÂNCIAS

X^+ Z^+ B^+ W^+ C^{++}

1 2 3

VOLUME EFLUENTE

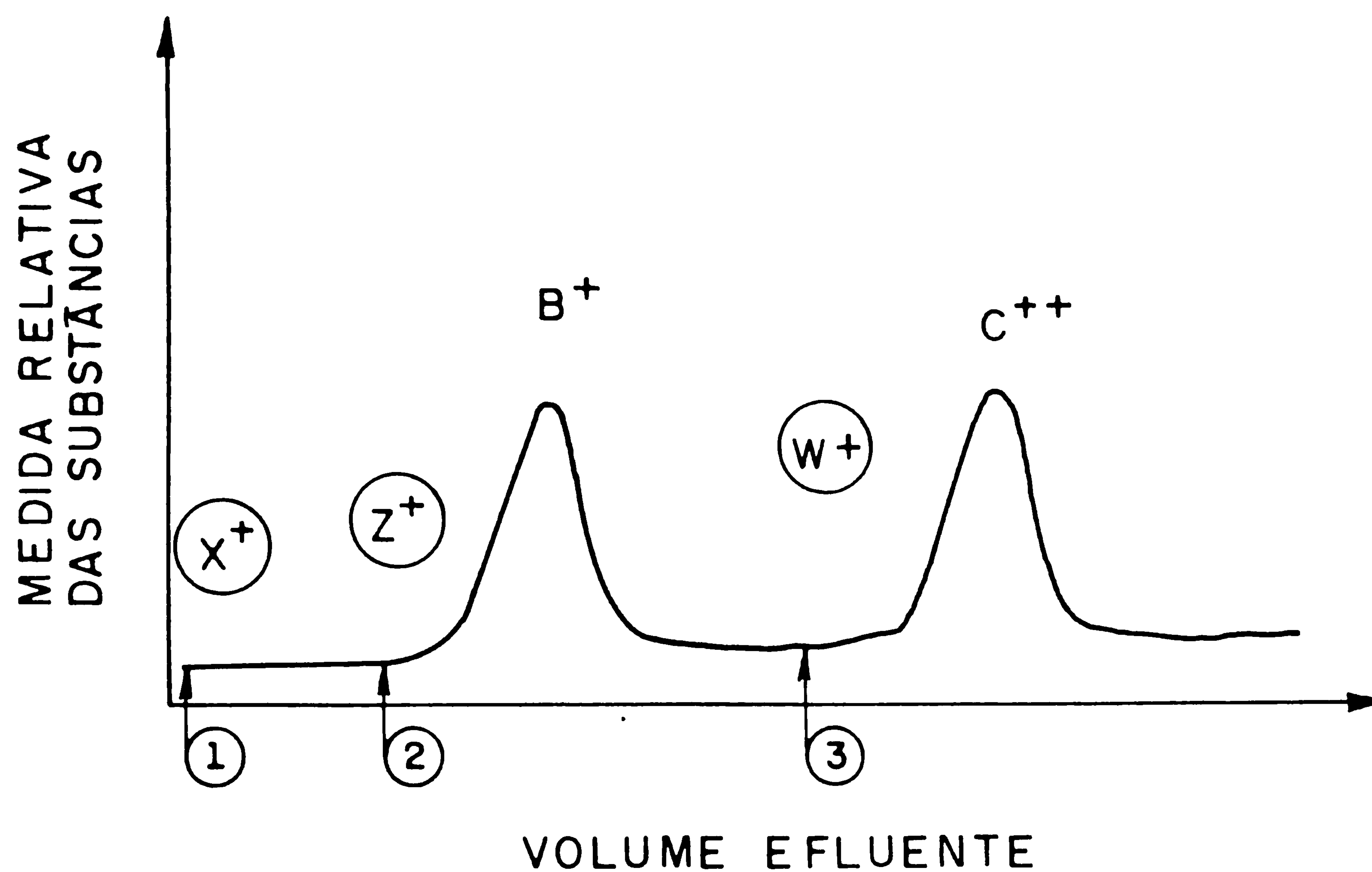



FIGURA V-2 Perfil de eluição hipotético, obtido na situação cromatográfica representada na Figura V-1. As setas 1, 2 e 3 referem-se às mudanças dos eluentes da coluna cromatográfica.

3. A MATRIZ

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. As matrizes, quanto ao material que as formam, são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas. Por serem, em geral, mais eficientes, são amplamente utilizadas como matriz, resinas orgânicas altamente polimerizadas, com ligações cruzadas.

Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos.

Os trocadores aniônicos, como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz *(Figura V-3)*. Os trocadores catiônicos, inversamente, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz *(Figura V-4)*.

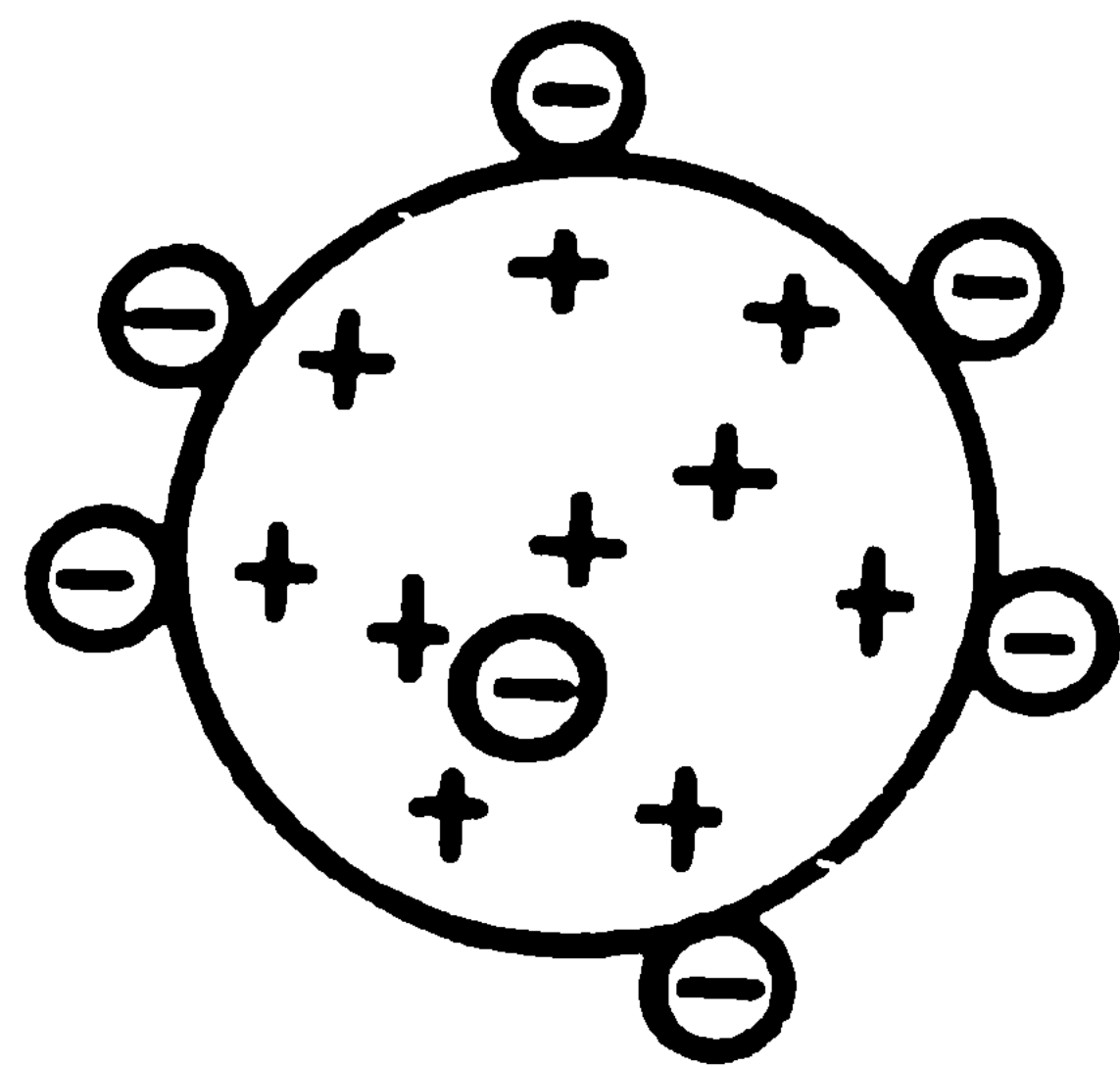



FIGURA V-3 Esquema de um trocador aniônico. O sinal + representa o grupo trocador ligado à matriz; o sinal -, os ânions que são adsorvidos.

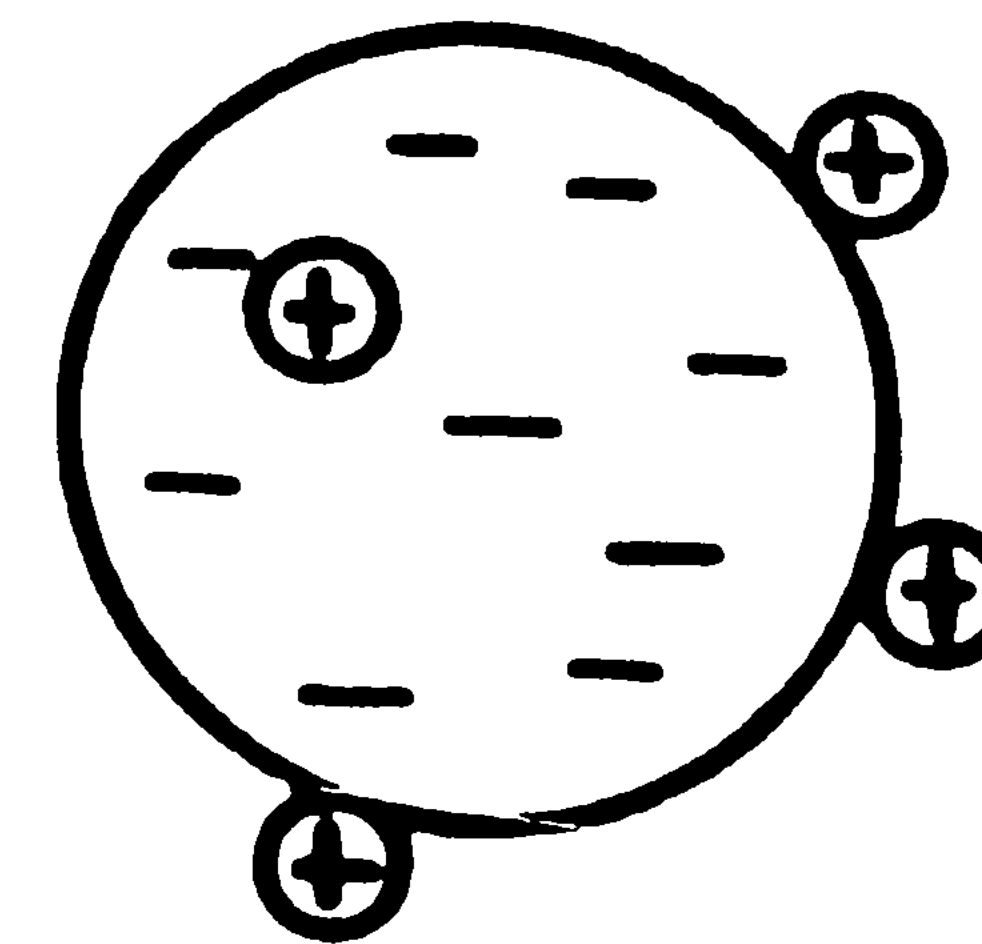



FIGURA V-4 Esquema de um trocador catiônico. O sinal - representa o grupo trocador; o sinal +, os cátions que são adsorvidos.

3.1. Trocadores inorgânicos naturais

Como citado anteriormente, os solos apresentam minerais que são capazes de atuar como trocadores iônicos. Segundo KRESSMAN, o cátion do mineral ativo do solo possui uma camada de estrutura cristalina. No grupo dos alumínio-silicatos, por exemplo, as camadas são compostas de planos de átomos de alumínio e silício. Muitos minerais possuem camadas cristalinas compostas de dois planos tetraédricos unidos em um octaedro plano, ficando os íons trocáveis entre as camadas destes planos.

Para ocorrer a troca iônica em um mineral, a estrutura molecular precisa ser suficientemente aberta para permitir o acesso dos íons a serem trocados. O tipo de estrutura difere muito de um para outro tipo, mas estes trocadores, em geral, apresentam pequena capacidade de troca. São atacados por ácidos ou por bases, sendo a propriedade de troca de íons afetada por valores de pH diferentes de 7,0.

3.2. Trocadores inorgânicos sintéticos

Uma das primeiras tentativas de se obter trocadores sintéticos inorgânicos coube a GANS, fundindo óxidos de alumínio, silício e sódio. Várias outras sínteses alternativas foram tentadas com a finalidade de testar as propriedades do trocador, cuja principal limitação é a de apresentar baixa capacidade de troca, além de ter vazão lenta, causando problemas na regeneração. Todavia, era insolúvel na água e resistente à desintegração.

Trocadores sintéticos podem ser preparados a partir de óxido de metais do grupo IV, como o zircônio e o tório e de ácidos do grupo V e VI, sendo um exemplo o fosfato de zircônio. Estes materiais apresentam a vantagem de serem muito estáveis à temperatura e à radiação nuclear.

3.3. Trocadores com matriz orgânica natural

Certas substâncias, como a lã, o cabelo, o couro (proteínas), a celulose e o agar (polissacarídeo) possuem propriedades trocadoras de capacidade muito baixa.

As proteínas são constituídas de aminoácidos, que são compostos anfóteros e, portanto, podem se comportar como cátions ou ânions, dependendo do pH a que estão expostas.

A celulose, como o agar, possui também propriedades trocadoras. Mediante tratamento químico simples, em geral, sulfonação, pode-se obter materiais trocadores catiônicos. Todavia, com tal processamento, os produtos obtidos são heterogênios e de pouco valor prático; a tentativa de se empregar o carvão como a matriz trocadora ilustra bem isso.

Em 1934, foi demostrado que certos carvões, sofrendo granulação e posteriormente tratados com ácido sulfúrico, davam origem a trocadores catiônicos que eram estáveis quimicamente e fisicamente em meios ácidos e alcalinos. Nesta época, a descoberta representou considerável avanço, desde que trocas envolvendo os íons hidrônio puderam ser realizadas, até então muito difíceis.

Os grupos sulfônicos eram, em grande parte, responsáveis pela troca de cátions, como também grupos carboxílicos produzidos simultaneamente à reação de oxidação. O carvão submetido a este tratamento químico foi usado para desmineralizar a água.

3.3.1. Os trocadores com matriz de celulose

A celulose é um biopolímero de glicose apresentando ligações cruzadas de pontes de hidrogênio, tendo grupos hidroxílicos que são facilmente oxidáveis a grupos carboxílicos, sendo esta a razão que capacita a celulose como trocador. Todavia, para efeito prático a celulose precisa ser tratada quimicamente. Agentes oxidantes transformam grupos hidroxílicos a carboxílicos de uma maneira homogênea, e a celulose, assim modificada, pode ser útil como um trocador.

Por tratamento químico conveniente é possível ligar a celulose a grupos trocadores catiônicos e aniônicos. Também, dependendo da finalidade, pode ser dado um baixo nível de substituição dos grupos hidroxila, visando uma baixa densidade de carga, que permite a eluição de moléculas de polieletrólitos sob condições brandas, ou então, uma alta densidade mais apropriada para a cromatografia de pequenas moléculas altamente carregadas.

No estado nativo, as cadeias polissacarídicas de celulose são unidas por ponte de hidrogênio formando regiões microcristalinas. Interpostas a estas regiões existem outras amorfas, com um menor número de pontes de hidrogênio. A hidrólise ácida limitada produz uma perda preferencial da região amorfa, resultando em celulose microcristalina.

No fim da década de 1970 foi colocado no mercado o DEAE-Sephacel, um trocador aniônico preparado a partir de celulose microcristalina de alta pureza, previamente hidratada, com partículas esféricas, porosas, de diâmetro variando de 40 - 160 μm, pronta para uso, apresentando ligações cruzadas com epiclorohidrina, além das pontes de hidrogênio encontradas naturalmente na celulose.

Os trocadores com matriz de celulose têm a vantagem de apresentar poros largos, facilitando assim o acesso das substâncias aos grupos trocadores e permitindo boa qualidade de vazão da fase móvel.

3.3.2. Os trocadores com matriz de dextrano

Dextrano é um biopolímero formado por unidades de glicose, unidas predominantemente por ligações α-D (1-6) e produzido por bactérias (**Leuconostoc misenteroides, Leuconostoc dextranicium**), tendo como substrato inicial a sacarose.

Sob o nome comercial de Sephadex (Pharmacia) é produzido um polímero modificado de dextrano, onde as macromoléculas apresentam ligações cruzadas de ponte de hidrogênio entre as suas cadeias, obtendo assim uma estrutura porosa tridimensional.

Por causa do seu alto conteúdo de grupos hidroxílicos, o Sephadex é fortemente hidrofílico e as partículas esféricas, produzidas deste material, são capazes de inchar consideravelmente em contato com a água, sendo possível formar vários tipos de poros conforme a sua capacidade de absorver água.

Por tratamento químico adequado, é possível ligar grupos trocadores às partículas esféricas de Sephadex. Os trocadores iônicos com matriz de Sephadex são derivados do Sephadex G-25 e Sephadex G-50, sendo que estes dois tipos diferem entre si quanto à porosidade das partículas esféricas.

Os trocadores iônicos baseados no Sephadex G-25 apresentam ligações cruzadas firmes, resultando em partículas de poros menores que aquelas com matriz de Sephadex G-50, que apresentam poros maiores, sendo estes, portanto, mais indicados para a cromatografia de substâncias com massas moleculares elevadas (ver Capítulo VI).

O pH e a força iônica dos eluentes são fatores que influenciam no grau de inchamento destes trocadores que, sendo esféricos e altamente porosos, permitem boas condições de vazão da fase móvel.

3.3.3. Trocadores com matriz de agarose

O agar é um polímero natural complexo extraído da alga **Rhodophyciae.** Ele é formado por cadeias polissacarídicas de agarose e agaropectina. Os grupos carregados presentes neste polissacarídeo são o sulfato e o carboxílico. A agarose contém menor número de grupos sulfatos, em relação à agaropectina, sendo por isso menos carregada.

A agarose foi introduzida por POLSON como um gel para cromatografia por exclusão. PORATH e col. prepararam um gel de agarose, livre de sulfato, com ligações cruzadas de bis-epoxi ou epicloridrina. Este tratamento resultou em um gel mais insolúvel e com ligações cruzadas mais homogêneas.

Como exemplos de trocadores que utilizam a agarose como matriz, podemos citar a DEAE-Sepharose CL-6B (aniônica) e a CM-Sepharose CL-6B (catiônica).

Estes trocadores apresentam uma matriz de grande rigidez, aliada a uma porosidade equivalente àquelas com matriz de dextrano modificado, tendo ainda boas qualidades de vazão da fase móvel.

3.4. Os trocadores orgânicos sintéticos

Em 1935, ADAMS e HOLMES desenvolveram resinas com propriedades trocadoras e bastante insolúveis. Estas resinas foram obtidas por condensação de fenóis poliídricos com formaldeídos. O trabalho destas pesquisas deu início a uma fase tecnológica de grande amplitude, possibilitando a produção de matrizes, de vários graus de porosidade, trocadoras de cátions e de ânions.

O trabalho pioneiro de ADAMS e HOLMES produziu resinas trocadoras de cátions. A estrutura típica destas resinas é dada na *Figura V-5.*

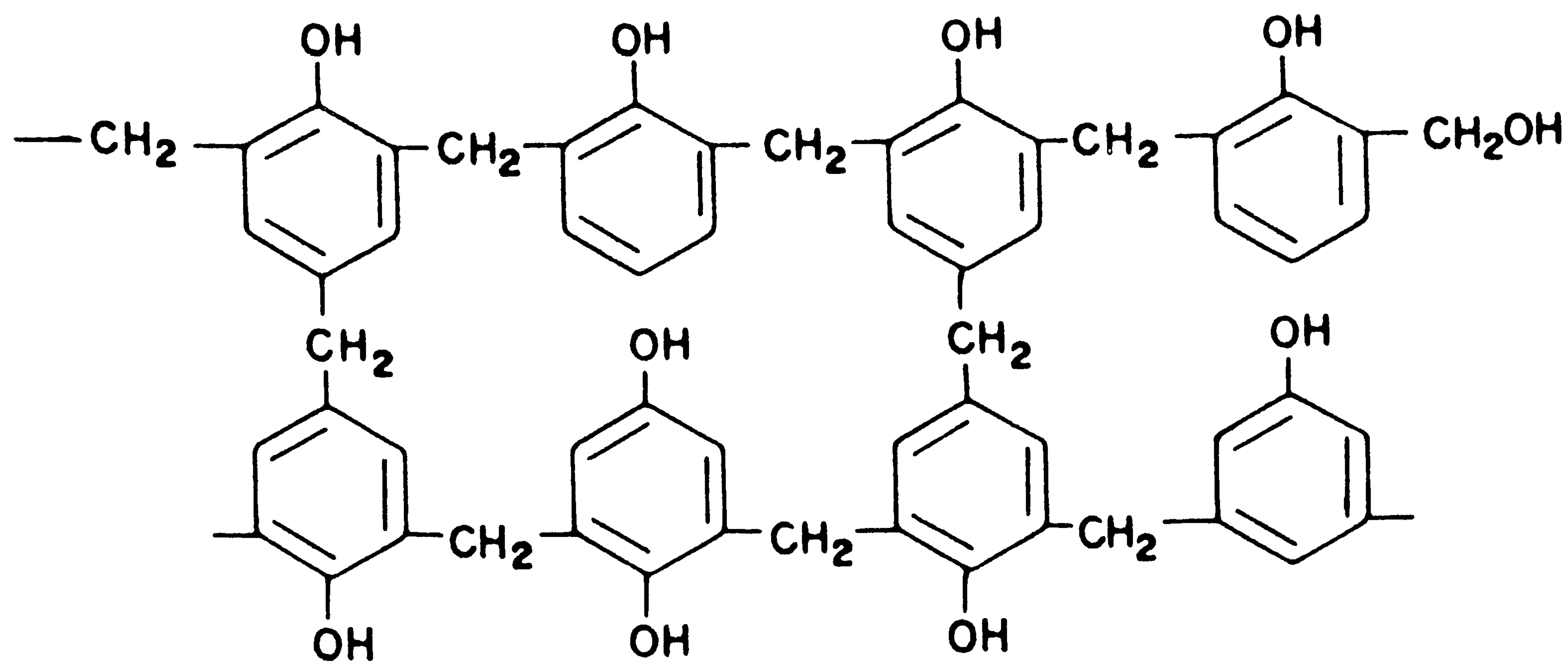
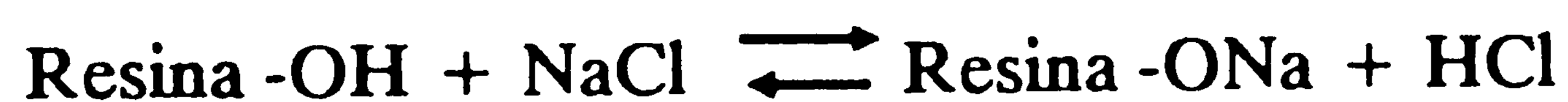



FIGURA V-5 Estrutura típica das resinas desenvolvidas por ADAMS e HOLMES, por condensação de fenóis com formaldeído.

O grupo responsável pela troca iônica é o -OH, que funciona como indica a equação, em meio ácido e neutro.

$$\text{Resina -OH} + NaCl \rightleftharpoons \text{Resina -ONa} + HCl$$

e, com maior eficiência, em valores de pH mais altos:

$$\text{Resina -OH} + NaOH \rightleftharpoons \text{Resina -ONa} + H_2O$$

Todavia, tais resinas apresentavam pequena capacidade de troca, pelo fato da baixa tendência do H^+ de desligar do grupo OH. Para aumentar a capacidade de troca destas resinas foram introduzidos grupos sulfônicos, em ataques a determinados sítios nos anéis aromáticos. A estrutura molecular típica destas resinas é apresentada na *Figura V-6.*

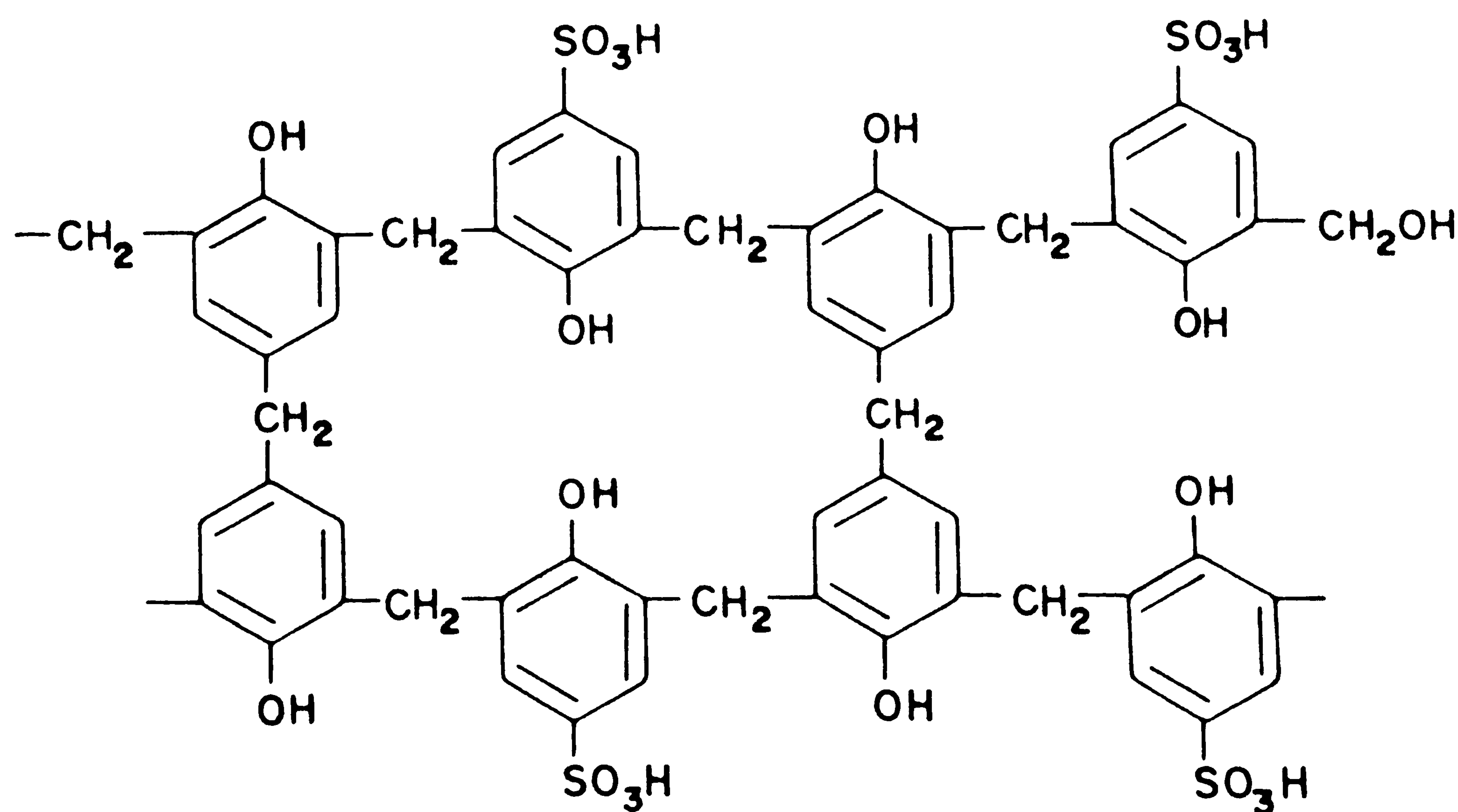



FIGURA V-6 Estrutura típica das resinas sulfonadas, produzidas pela condensação de fenóis com formaldeído.

Desta maneira, a resina passou a ser multifuncional com grupos trocadores sulfônicos e hidroxílicos, sendo que, em condições ácidas e neutras, somente o primeiro apresenta efetiva capacidade de troca; em meio básico, os grupos OH contribuem também na troca de cátions.

Um notável avanço nas resinas trocadoras ocorreu em 1942, quando D'ALELIO sintetizou resinas com base no estireno cruzado com divinilbenzeno, obtendo pequenos grânulos. As resinas trocadoras ácidas (catiônicas) foram preparadas por sulfonação do anel benzênico com ácidos sulfúrico concentrado ou com

ácido clorosulfônico. Elas têm maior quantidade de grupos sulfônicos, em comparação aos citados anteriormente *(Figura V-6)* e, em conseqüência, maior capacidade de troca.

A *Figura V-7* nos mostra o esquema do preparo destas resinas. As unidades divinilbenzeno estabelecem uniões com outras cadeias. O grau de ligações cruzadas (porosidade) é dado pela quantidade de divinilbenzeno presente na mistura polimerizante, sendo que porcentagens típicas são de 1, 2, 4, 8, 12 e 16. A porosidade é selecionada conforme o propósito a que se destina, sendo comumente designada por X-1, X-2, X-12, etc., onde o número indica a porcentagem em divinilbenzeno no polímero.

As resinas de troca básica (aniônicas) são preparadas por clorometilação seguida por uma reação com uma amina terciária ou outro reativo apropriado. A estrutura deste tipo de trocador pode ser imaginada com base na *Figura V-7*, substituindo-se grupos sulfônicos ($-SO_3^- H^+$) por $-CH_2-N^+R_3$ com OH^- ou Cl^-.

Além das resinas poliestuênicas e polifenólicas, outras são obtidas usando o metacrilato como matéria básica de construção.

As resinas trocadoras deste tipo são muito resistentes, têm grande estabilidade química, são monofuncionais, tendo alta capacidade de troca em toda faixa de pH.

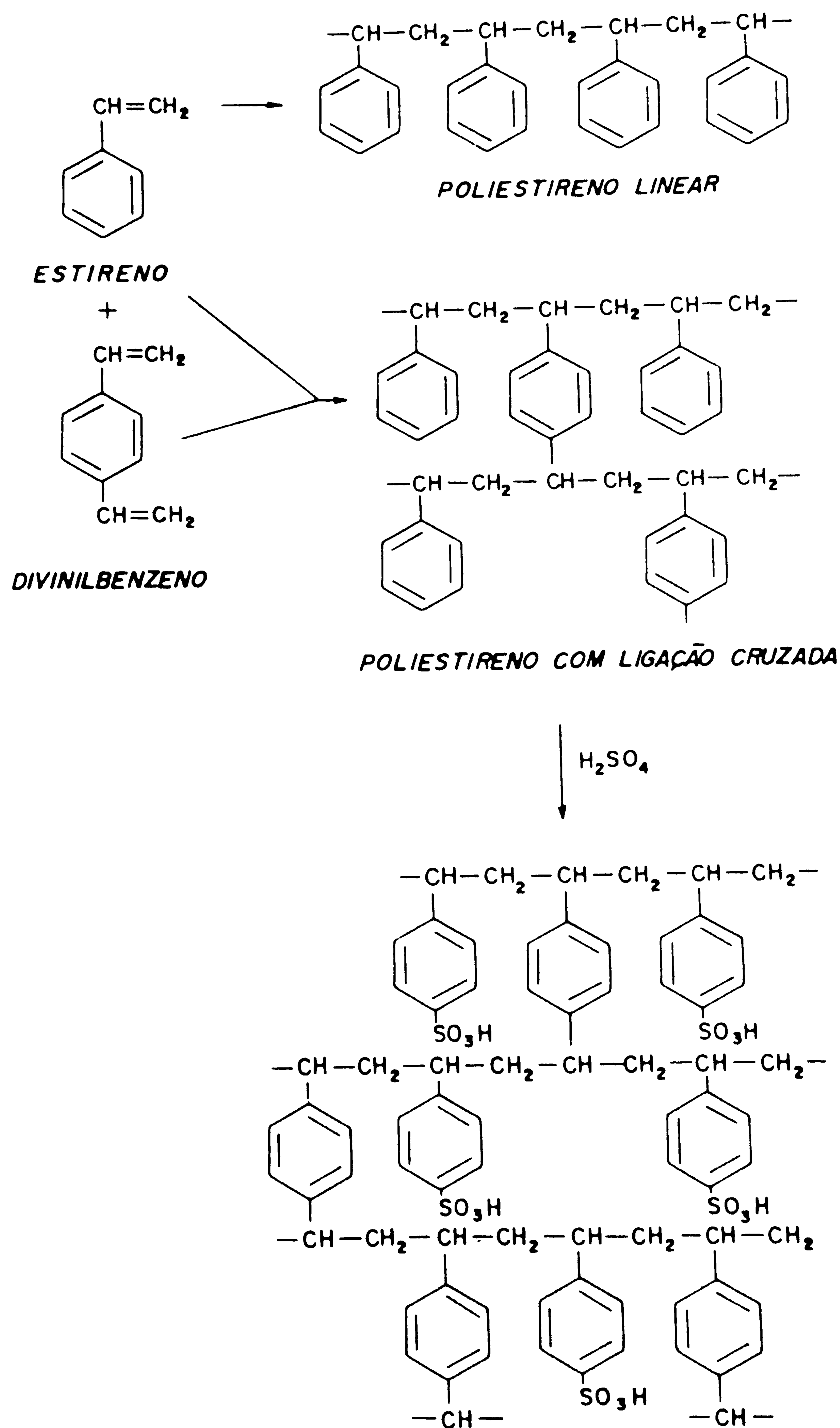



FIGURA V-7 **Polimerização e sulfonação das resinas com base no estireno-divinilbenzeno.**

3.5. Matrizes utilizadas em cromatografia liquida de alta eficiência

As resinas de estireno-divinilbenzeno foram pioneiramente utilizadas para a produção de partículas trocadoras (de aproximadamente 10 μm) para cromatografia por troca iônica de alta eficiência. Estas partículas trocadoras têm sido muito usadas. No entanto, apresentam a desvantagem de ter baixa rigidez à deformação por pressão e por dificultar a difusão das moléculas da substância-amostra para o interior do trocador. O resultado, utilizando este tipo de matriz, é uma coluna de menor eficiência, comparada com outras onde estes problemas são contornados.

Devido a isto, outros tipos de partículas trocadoras foram idealizadas por serem mais adequadas à cromatografia líquida de alta eficiência. Estas partículas são constituídas de um suporte rígido que é revestido com um polímero de estireno-divinilbenzeno, silicone ou fluorcarbono e derivatizado com grupos trocadores sulfônico ou amônio quaternário. Dependendo do tipo de suporte empregado, estas partículas são chamadas peliculares, com núcleo sólido de sílica ou porosas. Estes suportes ficam recobertos com uma fina camada do material trocador e, assim constituídos, são muito resistentes à deformação por pressão, facilitando a difusão das moléculas para o interior da película de revestimento. Isto resulta em um aumento na eficiência da coluna comparada àquelas formadas unicamente por polímeros. No entanto, estes contêm uma menor quantidade do material trocador, com menor capacidade que os baseados nas resinas.

3.6. Trocadores iônicos líquidos

A separação por troca iônica pode também ser realizada por trocadores líqüidos, que revestem suportes peliculares ou porosos. Eles são constituídos, em geral, de líquidos orgânicos, imiscíveis em água, que apresentam grupos iônicos ou ionizáveis.

Assim, o suporte inerte fica revestido por um filme líquido. Para os trocadores catiônicos são usados alquilésteres do ácido fosfórico e/ou alquilésteres do ácido alcano-fosfônico. Os trocadores líquidos aniônicos utilizam aminas de alta massa molecular ou compostos de amônio quaternário (por ex., trioctilmetilamônio).

4. OS GRUPOS TROCADORES

Os tipos de grupos ligados à matriz classificam os trocadores iônicos em fortes, médios e fracos. Os trocadores iônicos fortes são aqueles completamente ionizados em grande faixa de pH. A *Figura V-8* esquematiza as curvas típicas de trocadores ácido e básico fortes. Os trocadores iônicos fracos e médios são aqueles em que o grau de dissociação é influenciado pelo pH, sendo que, devido a este fato, a capacidade destes trocadores varia em função do pH. Na *Figura V-9* temos as curvas típicas de trocadores ácido e básico fortes.

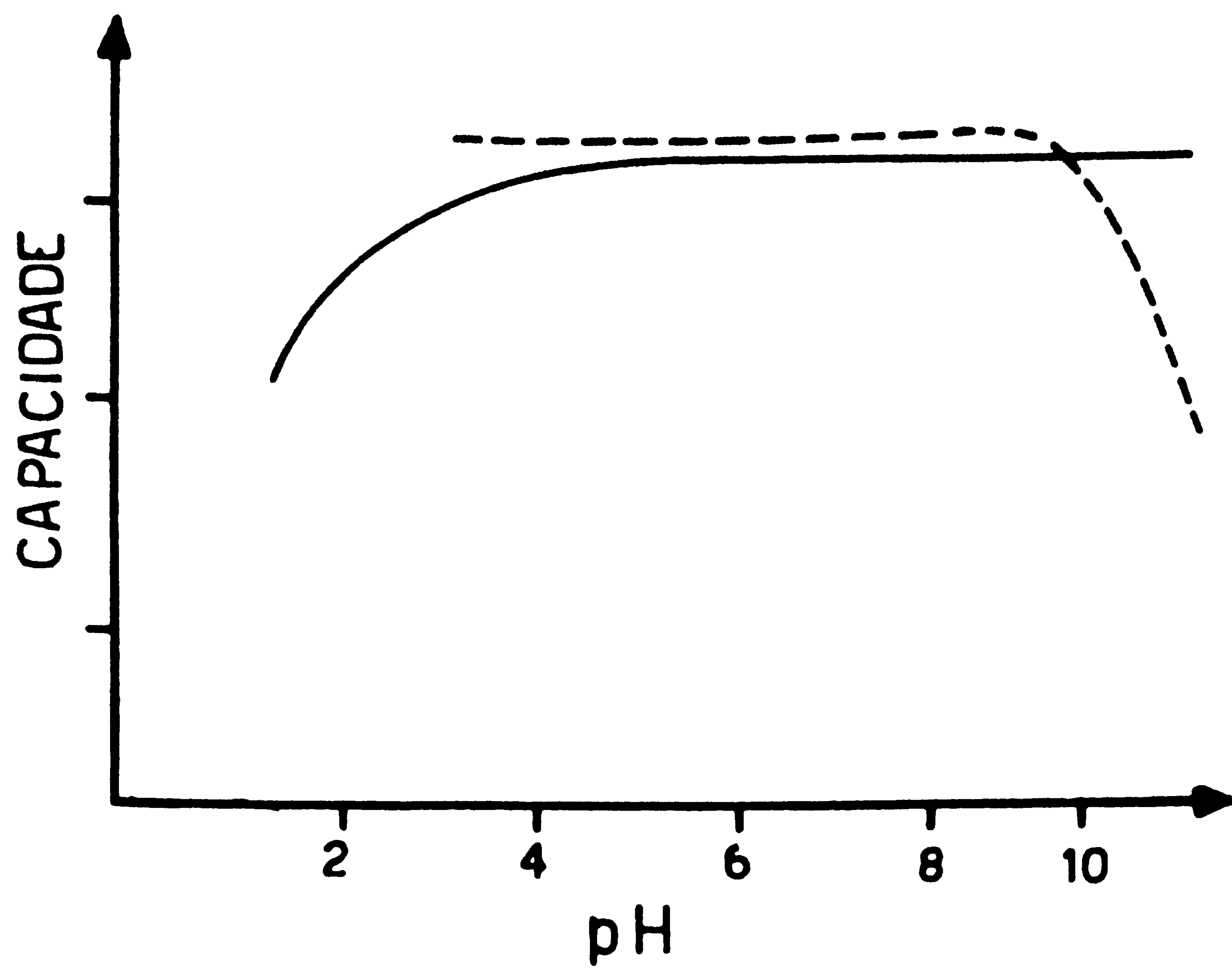



FIGURA V-8 Capacidades típicas de trocadores (—)ácido e básico (---) fortes.

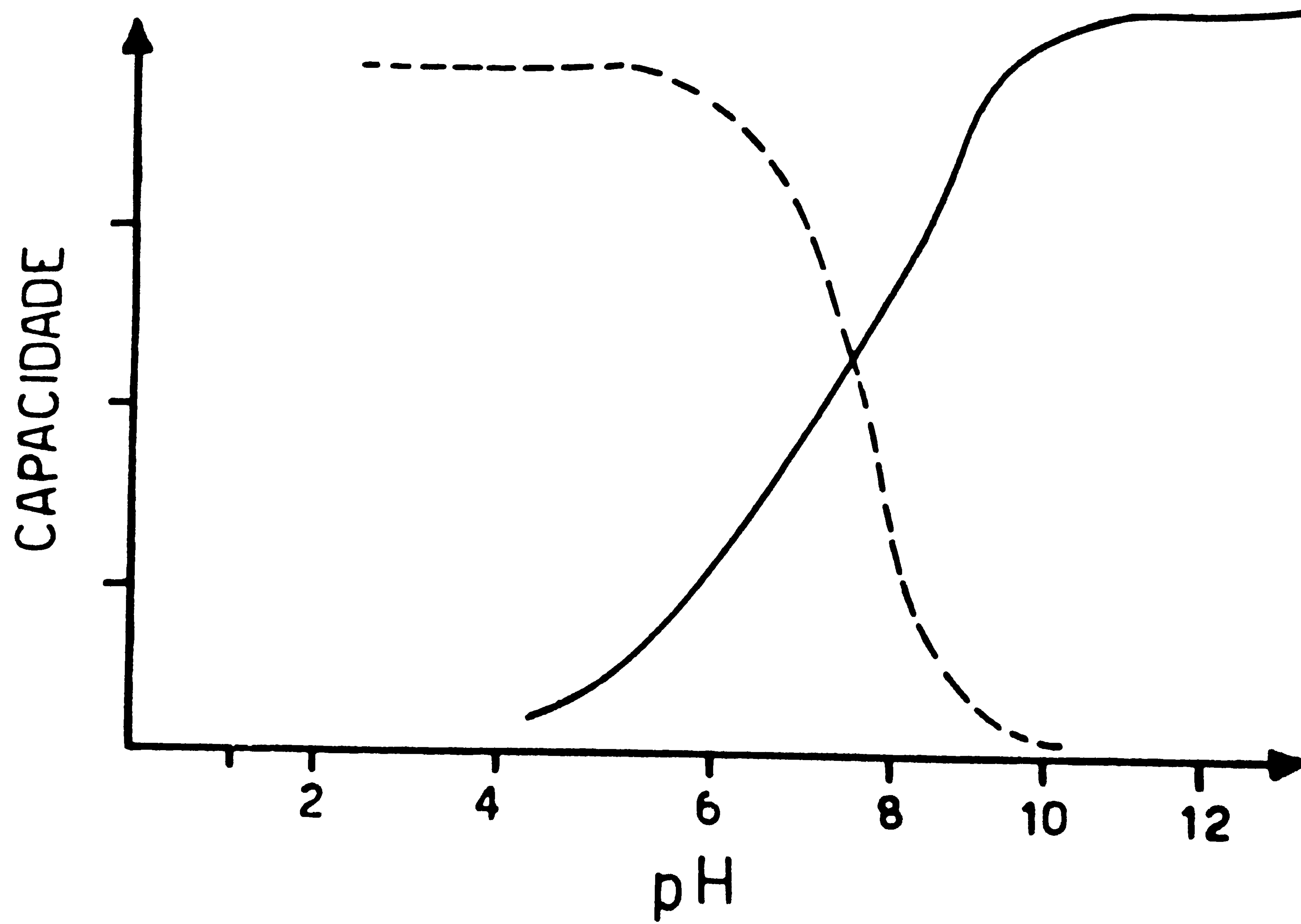



FIGURA V-9 Capacidades típicas de trocadores de ácido (—) e básico (---) fracos.

Nas *Tabelas V-1* e *V-2* temos exemplos de alguns tipos de trocadores iônicos comerciais, sendo classificados quanto à força do grupo trocador.

Tabela V-1

Exemplos de alguns tipos de trocadores baseados em polímeros sintéticos

Tipo	Constituição	Fórmula dos trocadores	Marcas registradas de trocadores equivalentes*					
Ácido forte	Grupos de ácido sulfônico ligados a copolímeros de estireno-divinilbenzeno	ϕ - SO_3H^+	Amberlite CG-120 IR-69 IR-124	Dowex 50W	Lewatit S-100	Ionac C - 240 C - 250	Zeocarb 225	Duolite C-20 C-225
Ácido fraco	Grupos de ácido carboxílico ligados a copolímeros de ácido metacrílico e divinilbenzeno	$-CH-COO^-Na^+$	Amberlite CG-50 IRP-64 IRC-84	Dowex CCR-1 MWC-1	Lewatit CNO	Ionac CC CCN	Zeocarb 226	Duolite C-443 C-464
Base forte	Grupos de amônio quaternário ligados a copolímeros do estirenodivinilbenzeno	ϕ $-CH_2N^+(CH)_3Cl^-$	Amberlite CG-400 IRA-401 IRA-420	Dowex 1	Lewatit M-500 M-5020 M-5080	Ionac A-540 A-440 A-546	Zerolit FF Permutit S-1	Duolite A-104 A 101D A-109
Base fraca	Grupos de polialquiamina ligados a copolímeros de estirenodivinilbenzeno	ϕ $-N^+HR_2Cl^-$	Amberlite IR-45	Dowex 3 WGR	Lewatit MIH	Ionac A-375 A-260	Zerolit G	Duolite A-6 A-4F A-340

Fabricantes* - Amberlite: Rohm & Hass/TosoHaas, EUA
Dowex: Dow Chemical Co., EUA
Lewatit: Pharbenfabriken Bayer, RFA
Ionac: Ionac Chemical Co., EUA
Zeocarb, Zerolit e Permutit: Permutit Co., Inglaterra
Duolite: Diamond Alkali Co., EUA

Tabela V-2

Exemplos de alguns tipos de trocadores baseados em polímeros naturais

Tipo	Sigla	Denominação	Estrutura	Matriz	Exemplo	Fabricante
Ácido forte	SP	Sulfopropil	$-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^-H^+$	Dextrano	SP-Sephadex	Pharmacia
Ácido fraco	CM	Carboximetil	$-CH_2-COO^-H^+$	Dextrano Celulose	CM-Sephadex Cellex-CM	Pharmacia Bio-Rad
Base forte	QAE	Dietil- (2-hidroxipropil) aminoetil	$-C_2H_4-N^+(C_2H_5)_2CH_2CHOHCH_3Cl^-$	Dextrano Celulose	QAE-Sephadex Cellex-QAE	Pharmacia Bio-Rad
Base intermediária		Dimetilaminoetil e dimetilamino-hidroxietil	$-CH_2-N(CH_3)_2$ e $-CH_2-N^+(CH_3)_2C_2H_4OHCl^-$	Epoxipoliamina	Bio-Rex 5	Bio Rad
Base fraca	DEAE	Dietilaminoetil	$-CH_2-CH_2-N^+(H)-(C_2H_5)_2OH^-$	Dextrano Agarose Agarose Celulose Celulose	DEAE-Sephadex DEAE-Sepharose DEAE-BioGel A DEAE-Sephacel Cellex-D	Pharmacia Pharmacia Bio-Rad Pharmacia Bio-Rad
	ECTEOLA	Trietanolamina e outras aminas ligado à celulose através de cadeias poliglicóis	$-CH_2-N^+(C_2H_4OH)_3OH^-$ e outros	Celulose	Cellex-E	Bio-Rad

5. PROPRIEDADES DE TROCADORES IÔNICOS

5.1. Capacidade

De uma maneira geral, a capacidade de um trocador é uma medida da quantidade de troca de íons que pode ocorrer entre a matriz e os íons presentes na fase móvel.

A capacidade total é a quantidade de grupos carregados, ou potencialmente carregados, que podem ser trocados por grama de peso seco do trocador. A capacidade total é expressa em meq/g ou meq/100 mL de supensão da resina, sendo determinada por titulação.

A capacidade disponível é a capacidade real do trocador sob determinadas condições. Ela é dependente de vários fatores, entre os quais temos a força iônica, o pH e a temperatura do eluente.

A *Tabela V-3* fornece alguns exemplos de capacidade de trocadores iônicos, sendo que os valores apresentados servem como base de cálculo inicial para a quantidade do material trocador a ser usado na montagem da coluna por cromatografia. Todavia, a capacidade real só poderá ser obtida nas condições de operação da coluna cromatográfica sendo particularizada à cada aplicação.

Tabela V-3

Capacidade de alguns trocadores iônicos

Trocador	Tipo	Capacidade total meq/g[a]	meq/100mL[b]
Dowex 50 X-8	ácido forte	5,1	170
Amberlite IR-120	ácido forte	---	190
SP-Sephadex C-25	ácido forte	2,3 ± 0,3	30
Amberlite IRC-84	ácido fraco	---	400
CM-Sephadex C-25	ácido fraco	4,5 ± 0,5	56
CM-Sepharose CL-6B	ácido fraco	---	12
CM-Cellex	ácido fraco	0,7 ± 0,1	---
Dowex 1	base forte	3,2	140
Amberlite IRA 400	base forte	---	140
QAE-Sephadex A-25	base forte	3,0 ± 0,4	50
Dowex 3 X-4	base forte	2,8	190
Amberlite IRA 45	base forte	---	190
DEAE-Sephadex A-25	base forte	3,5 ± 0,5	50
DEAE-Sepharose CL-6B	base fraca	---	15
DEAE-Sephacel	base fraca	1,4 ± 0,1	17,1
Cellex D	base fraca	0,7 ± 0,1	---

a: Valor obtido por titulação e referente à quantidade total de miliequivalentes em relação ao peso seco do trocador usado na determinação.

b: Valor obtido tomando por base 100 mL da suspensão do trocador.

5.2. Seletividade

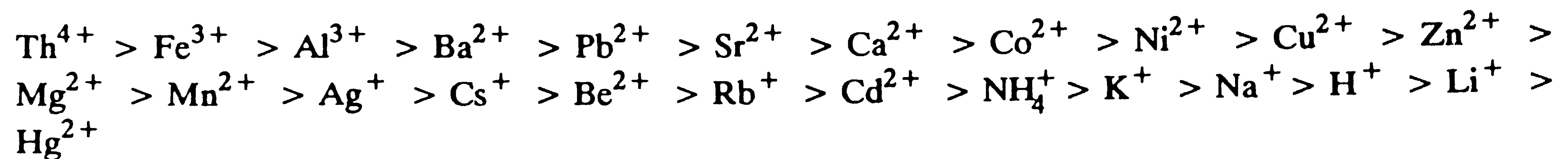
O conhecimento da seletividade de um trocador é muito importante para o seu emprego. Embora este fator dependa muito das condições de operação da coluna, pode-se destacar que:

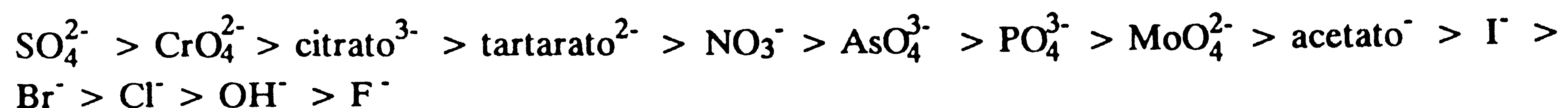
a. a seletividade de um trocador aumenta com o incremento do grau das ligações cruzadas da matriz.

b. íons com carga elevada são ligados mais fortemente ao trocador que íons de baixa carga, nas mesmas concentrações.

c. íons com a mesma carga, porém com diferentes tamanhos em solução, têm grau de afinidade diferentes. Este efeito se relaciona melhor com o poder de polarização do íon e seu grau de hidratação, sendo que a afinidade diminui com o aumento do raio do íon hidratado.

Com base nos itens b e c, pode-se classificar os cátions na seguinte ordem decrescente, quanto ao grau de afinidade em um trocador catiônico fortemente ácido.

$Th^{4+} > Fe^{3+} > Al^{3+} > Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ag^{+} > Cs^{+} > Be^{2+} > Rb^{+} > Cd^{2+} > NH_4^{+} > K^{+} > Na^{+} > H^{+} > Li^{+} > Hg^{2+}$

E para ânions, a seguinte ordem:

$SO_4^{2-} > CrO_4^{2-} >$ citrato$^{3-} >$ tartarato$^{2-} > NO_3^{-} > AsO_4^{3-} > PO_4^{3-} > MoO_4^{2-} >$ acetato$^{-} > I^{-} > Br^{-} > Cl^{-} > OH^{-} > F^{-}$

Todavia, em altas concentrações a ordem de afinidade pode ser bem diferente, sendo o efeito da valência diminuído, às vezes até invertido. O mesmo fenômeno pode ser produzido por temperaturas altas ou por mudança da fase móvel.

Para uma medida quantitativa da seletividade de um trocador consideraremos o equilíbrio:

$$M^{+} + R\text{-}H \rightleftharpoons H^{+} + R\text{-}M$$

onde R-H é o trocador protonado e R-M o trocador ligado ao íon M . Nesta situação, pode-se escrever:

$$K_D = \frac{aH^{+} \times aR\text{-}M}{aM^{+} \times aR\text{-}H}$$

onde *a é atividade das formas indicadas e* K_D o coeficiente de distribuição.

Em geral, quanto mais alto o valor do coeficiente de distribuição mais fortemente o íon interage com o trocador. O coeficiente de distribuição é uma função de muitos parâmetros experimentais como pH, carga iônica, porosidade do trocador, força iônica, tipo de solvente utilizado e temperatura. As idéias aqui expostas servem apenas como guia para iniciar as operações de uma coluna trocadora de íons. Em resumo, o trocador iônico prefere:

a. os íons que têm alta carga;

b. os íons que têm pequeno tamanho (solvatado);

c. íons altamente polarizáveis;

d. íons que têm fracas interações com a fase móvel.

6. FATORES QUE INFLUENCIAM A CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

6.1. A escolha do trocador iônico

A escolha de um trocador iônico deve ser orientada em função da finalidade a que se destina. As colunas cromatográficas utilizadas em técnicas preparativas apresentam maior secção transversal que aquelas utilizadas em técnicas analíticas. Além disso, em geral, os trocadores iônicos usados em cromatografia preparativa apresentam poros maiores, com partículas trocadoras também maiores (150 - 300μm), que facilitam a vazão, tendo, portanto, grande capacidade.

Os trocadores iônicos utilizados em cromatografia analítica, em geral, apresentam poros menores com partículas trocadoras menores (40 - 75 μm) tendo, em geral, menor capacidade mas alta resolução. A utilização de colunas com pequena secção transversal implica em picos mais altos e mais estreitos, aumentando a sensibilidade de forma independente do método de detecção utilizado, causando, no entanto, maior resistência à vazão.

A porosidade de um trocador iônico não altera o mecanismo de ligação dos íons presentes na fase móvel, mas influencia na sua capacidade, pois impede o acesso de moléculas maiores a grupos trocadores nos poros interiores da matriz.

Conhecendo-se o material a ser separado, com finalidade analítica ou preparativa, escolhe-se o trocador conveniente (aniônico ou catiônico) com base nas suas propriedades ácido-bases.

6.2. A seleção da fase móvel

A fase móvel pode ser constituída por soluções ácidas, básicas ou ainda por soluções tampões. Nestas, podem ser adicionados sais neutros ou solventes orgânicos, com a finalidade de se aumentar a seletividade para determinado propósito.

Quando a fase móvel é uma solução tampão, sua escolha é função do valor em que se pretende manter o pH. A faixa de boa capacidade tamponante está ao redor do pKa (± 1) do ácido conjugado empregado no preparo do tampão. Na literatura encontram-se vários tampões utilizados em cromatografia por troca sendo os mais comuns o fosfato, o borato, o **Tris** (Tri-hidroximetilaminometano), o citrato e o acetato. Em aplicações preparativas em que não se deseja obter resíduos salinos utiliza-se os tampões voláteis, como o acetato de piridina. A concentração dos tampões geralmente utilizados em cromatografia por troca iônica está na faixa de 1×10^{-3} M a 5×10^{-1} M, no entanto concentrações maiores também podem ser usadas.

A adição de sais neutros, como o cloreto de sódio no tampão de eluição, aumenta a força iônica da fase móvel e, assim, se tem uma outra variável para modificar a afinidade do trocador iônico pelos materiais

usados como amostra; a diminuição de 2 a 3 °C na temperatura causa um apreciável aumento no pH. Além disso, as macromoléculas podem sofrer alterações consideráveis na sua conformação na faixa de temperatura 45-50 °C, implicando em alterações no comportamento cromatográfico.

Para propósitos bioquímicos preparativos, a cromatografia é freqüentemente realizada a baixa temperatura (ao redor de 4°C) para prevenir a desnaturação de macromoléculas termolábeis como as proteínas. Neste caso, o tratamento prévio do trocador iônico, a montagem da coluna, bem como a regulação da vazão devem ser feitos na temperatura de operação da coluna. Por outro lado, para propósitos bioquímicos analíticos, as colunas de troca iônica são mantidas em temperaturas entre 50-60°C como nos analisadores de aminoácidos.

Como anteriormente mencionado, a temperatura ideal de operação de uma coluna cromatográfica de troca iônica deve ser determinada praticamente, observando-se a forma e simetria dos picos, tendo em conta a estabilidade da amostra, da matriz do trocador e as alterações possíveis de pH e de força iônica.

6.3. A amostra

A quantidade de amostra a ser aplicada em um trocador iônico depende de sua capacidade. Em geral, a quantidade aplicada está na faixa de 1-5% da capacidade total do trocador. Excesso de material implica em perda na resolução e enquanto quantidades muito pequenas podem levar dificuldades na quantificação.

O volume em que deve estar a amostra, respeitada a capacidade total do trocador, deve ser entre 1-5% do volume total do trocador. Em cálculo aproximado, o volume do trocador pode ser calculado com base no diâmetro interno da coluna e na sua altura.

Para exemplificar, considere uma coluna de SP-Sephadex C-25 de 20 x 4,0 cm. Conforme informação do fabricante a capacidade total deste trocador é de 30 meq/100 mL em força iônica de 0,1.

Assim temos:

a. volume da coluna: $\pi r^2 a = 3{,}14 \times (4{,}0 / 2)^2 \times 20 = 251 \text{ cm}^3$

b. capacidade total do trocador em 250 mL = 30 x 2,5 = 75 meq

c. quantidade máxima de amostra = 5% de 75 = 3,75 meq

d. volume máximo da amostra = 5% de 250 mL = 12,50 mL

A amostra, se em maior volume que o indicado, deve ser concentrada por evaporação do solvente ou dialisada contra o tampão usado para preparar o trocador iônico.

7. ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

A eluição da coluna de cromatografia pode ser feita usando o próprio tampão utilizado no preparo da coluna. Neste caso, a cromatografia é chamada de equilíbrio. Em geral, este tipo de cromatografia leva à separação mais lenta dos componentes do que aquela em que há troca de tampões, mas, às vezes, deve-se recorrer a este tipo de cromatografia para separar dois componentes que apresentam cargas semelhantes (por ex., aminoácidos de pontos isoelétricos próximos). A *Figura V-10* ilustra este tipo de cromatografia.

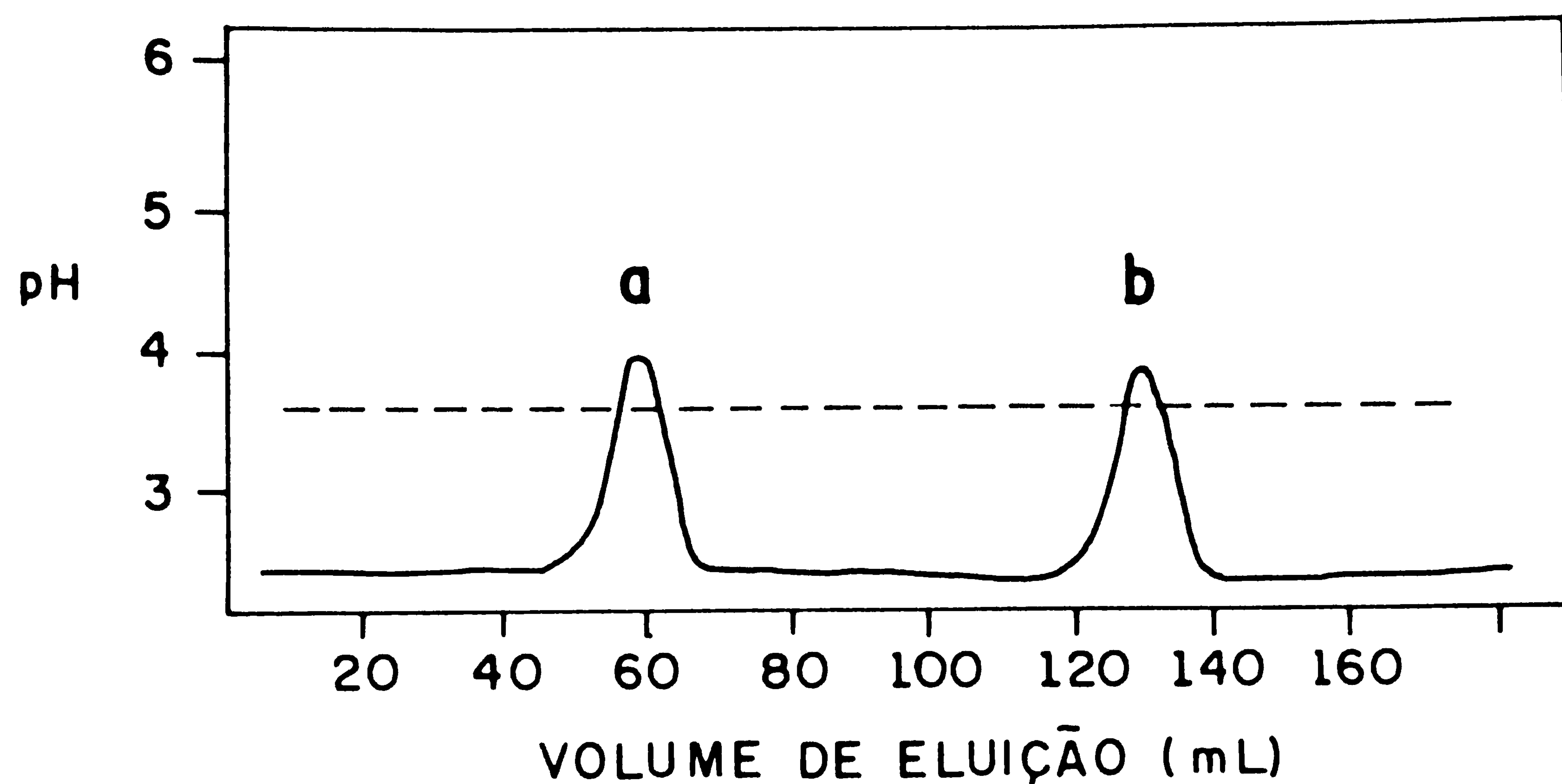



FIGURA V-10 Eluição hipotética de uma coluna trocadora de cátions com o mesmo tampão usado na preparação do trocador. A e B são substâncias anfóteras de pIs diferentes.

Outra possibilidade de eluição de uma coluna cromatográfica é por mudanças em fases discretas de pH ou de força iônica, ou ainda, de uma combinação destes fatores. A mudança de pH do tampão eluente em direção ao ponto isoelétrico de uma das substâncias-amostra causa a diminuição da carga-líquida, sendo mais facilmente eluída do trocador. A *Figura V-11* mostra o perfil de eluição de uma cromatografia hipotética realizada por mudanças de pH por fases discretas.

A força iônica pode ser variada para se obter a eluição mais lenta ou eluição mais rápida de substâncias. Abaixando-se a força iônica a competição pelos grupos carregados do trocador é mínima e as substâncias são ligadas fortemente a ele. Aumentando-se a força iônica aumenta-se a competição e reduz-se a interação entre o grupo trocador e as substâncias-amostra, que são assim eluídas.

Tanto o pH como a força iônica podem ser variados de uma maneira contínua e constante com o uso de gradientes. Estes podem ser lineares, côncavos e convexos. Outros gradientes mais complexos podem ser obtidos com o uso de sistemas de bombeamento para gradientes ou pelo uso de bombas peristálticas adaptadas para esta finalidade. A *Figura V-12* mostra esquema de três aparelhos para produzir gradientes lineares, côncavos e convexos para cromatografia de baixa pressão (BOCK e LING).

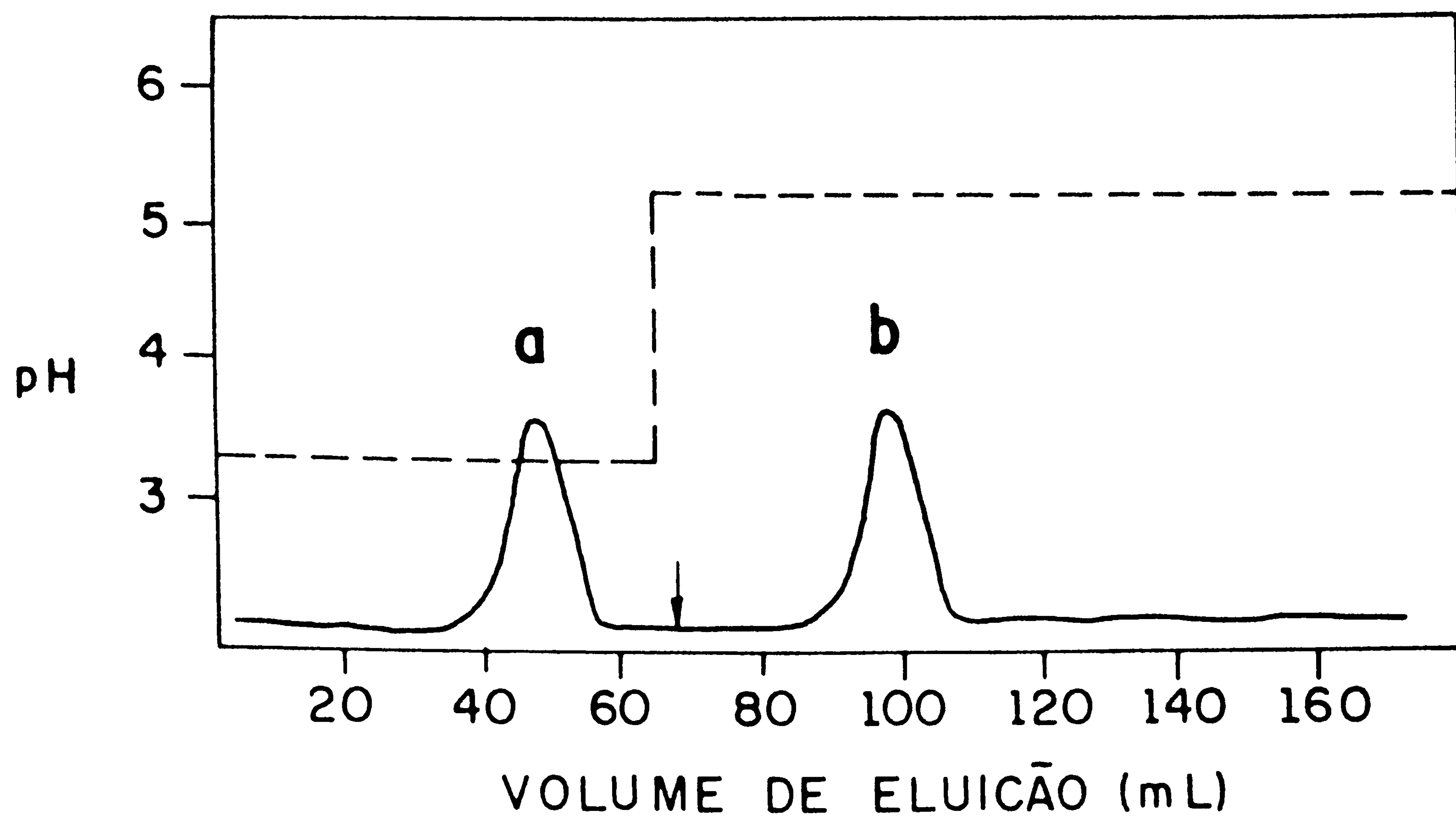



FIGURA V-11 Eluição hipotética de uma coluna trocadora de cátions por mudanças discretas de pH. A seta indica a troca do tampão eluente. A e B são substâncias anfóteras de pIs diferentes.

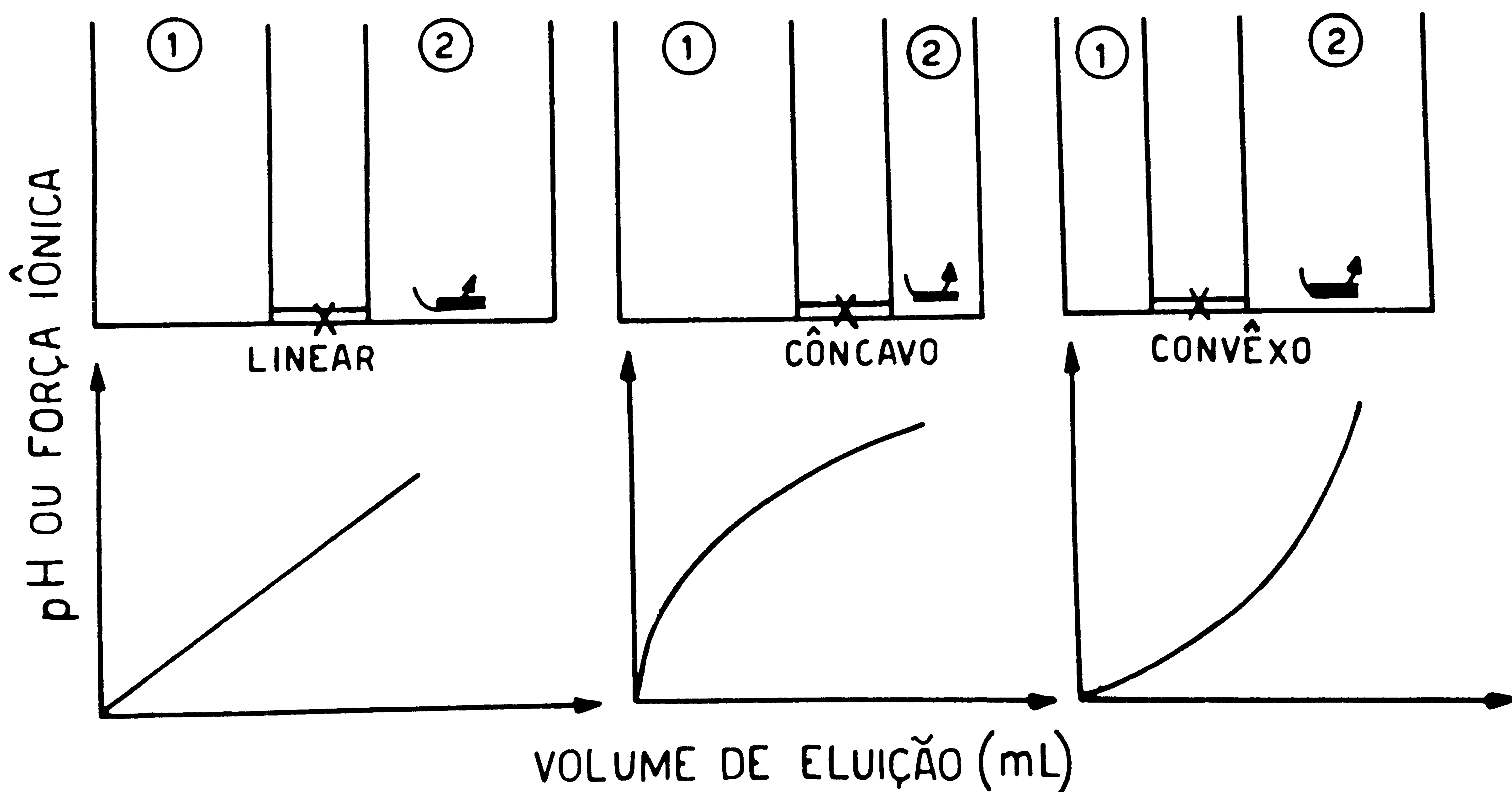



FIGURA V-12 Aparelhos simples para a produção de gradientes lineares, côncavos e convexos. No reservatório 2 dos aparelhos temos a presença de agitador para homogenização da mistura de dois tampões de diferentes pHs ou de mesmo pH e força iônica diferente.

A forma do gradiente também varia em função do volume de tampão eluente utilizado. O aumento de volume leva a uma diminuição da inclinação da curva do gradiente, o que resulta em um aumento na resolução. A *Figura V-13* ilustra este fato, utilizando um gradiente linear a um determinado volume, ao dobro deste volume e ao quádruplo do primeiro volume (por ex., 100 mL, 200 mL e 400 mL).

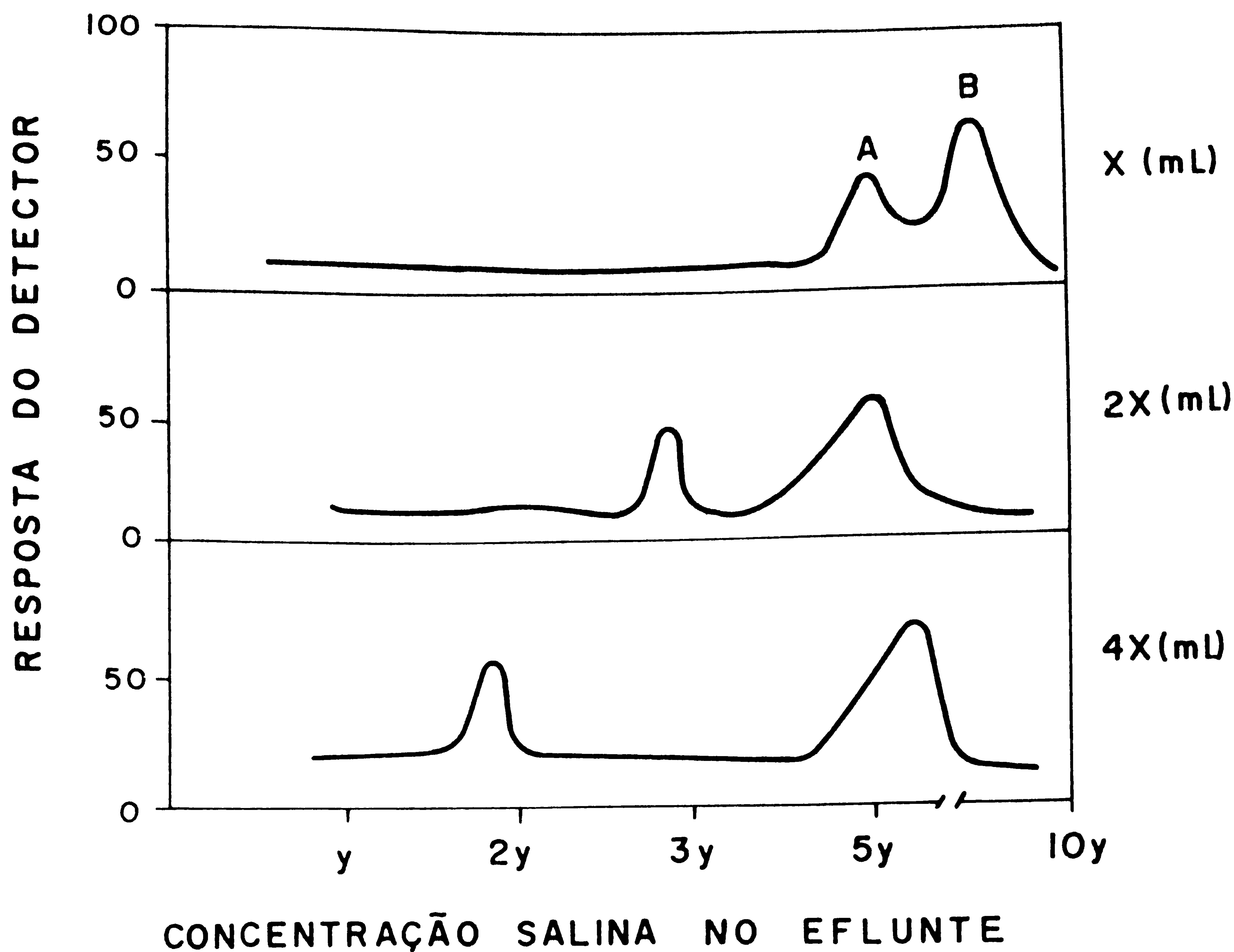



FIGURA V-13 Efeito do volume dos tampões de um gradiente linear na resolução. A e B são substâncias a serem separadas, sendo que A responde à mudança de inclinação do gradiente. Y é a concentração do tampão no reservatório 1 e 10Y é a concentração no tampão no reservatório 2.

8. APLICAÇÕES

A cromatografia por troca iônica apresenta muitas aplicações analíticas e preparativas, tanto em pesquisa, como nas indústrias.

A desionização da água e de muitos licores açucarados de frutos, bem como a despigmentação destes são as aplicações mais rotineiras da cromatografia por troca iônica, sendo produzidas resinas específicas para tais finalidades.

Em química analítica este tipo de cromatografia é usado na análise de elementos, geralmente complexados, na análise de íons ou na sua eliminação quando estes interferem na dosagem de uma determinada substância ou ainda na separação de misturas de compostos carregados.

Na literatura encontram-se vários trabalhos de separação de metais usando resinas com matriz de poliestireno-divinilbenzeno.

Muitos metais de transição formam complexos aniônicos com o cloro em meio de ácido clorídrico. É possível controlar o processo de formação destes complexos, pois o equilíbrio é dependente da concentração

do ácido clorídrico. Dependendo do metal, a carga é modificada, o que permite a diferença de afinidade na ligação com o trocador iônico e, em conseqüência, as separações:

$$M^{3+} \longrightarrow MCl^{2+} \longrightarrow MCl^{+}$$

Um exemplo clássico é a separação do níquel, manganês, cobalto, cobre, ferro e zinco, utilizando-se uma coluna de troca aniônica, eluída a concentrações variáveis de ácido clorídrico (KRAUS e MOORE). *A Figura V-14* ilustra esta separação. A eluição começa com ácido clorídrico concentrado (12 M). O íon níquel tem baixa tendência em formar complexos com o cloro e é eluído rapidamente. O manganês é eluído a uma concentração de ácido clorídrico igual a 6 M, o cobalto a 4 M, o cobre a 2,5 M, o ferro a 0,5 M e o zinco a 0,005 M.

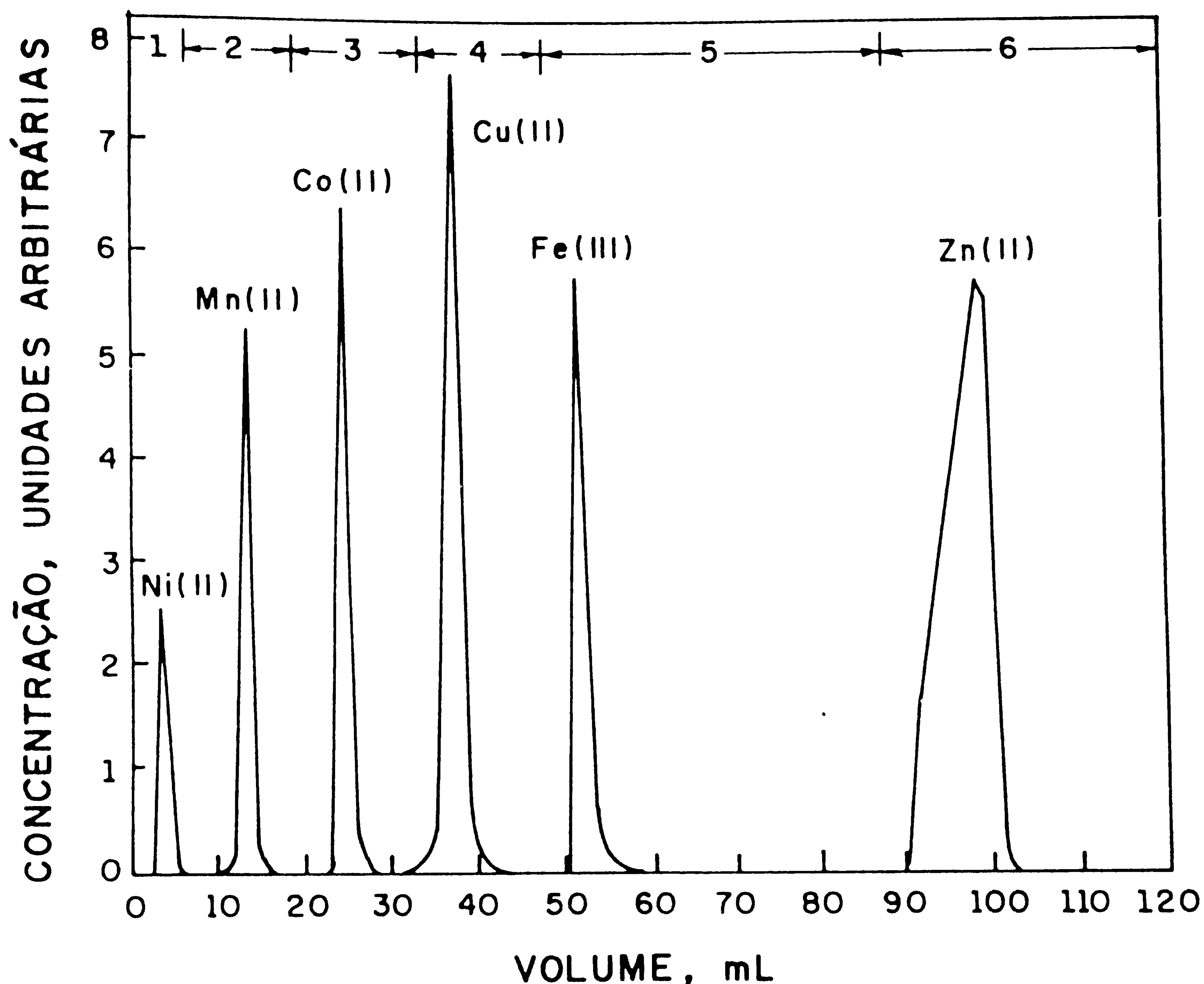



FIGURA V-14 Separação de metais de transição (Mn a Zn) a concentrações variáveis de HCl. Coluna de Dowex 1 de 26 x 0,29 cm operada a uma vazão de 30 mL/hora. Concentração de HCl: 1 = 12M; 2 = 6M; 3 = 4M; 4 = 2,5M; 5 = 0,5M; 6 = 0,005M.

A separação dos lantanídeos em uma coluna trocadora catiônica, eluída por tampões citrato, é um outro exemplo de separação de elementos que envolve complexação e mudança dos raios iônicos (KETELLE e BOYD).

Atualmente, com a elaboração de resinas trocadoras de partículas de pequeno diâmetro, com alta resolução e que podem suportar altas pressões, aliada a técnicas de detecção muito sensíveis, tem ampliado muito o campo de aplicação da cromatografia por troca iônica. Um exemplo é a determinação dos produtos de decomposição de elementos radioativos de meia-vida de poucos minutos (HORWITZ e col.).

No campo de estudo bioquímico e/ou biomédico este tipo de cromatografia tem sido aplicada freqüentemente, tanto com objetivos preparativos ou analíticos.

Na preparação e purificação de macromoléculas, a cromatografia por troca iônica tem um destaque especial, sendo raros os processos de purificação que não a utilizam. Uma interessante aplicação da cromatografia por troca iônica é na separação de isoenzimas. As isoenzimas têm massas moleculares próximas, sendo portanto a separação baseada em processos de diferença de carga elétrica que são , às vezes, pequenas (FLETCHER e col.).

A separação de drogas e seus metabolitos tem sido outro interessante exemplo de aplicação da cromatografia por troca iônica (SNYDER e KIRKLAND).

A cromatografia por troca iônica tem sido intensamente utilizada em autoanalisadores de aminoácidos. O trabalho pioneiro de SPACKMAN, STEIN e MOORE em 1958, no Rockefeller Institute Nova York, conseguiu um esquema funcional de separação de aminoácidos, utilizando-se duas colunas de cromatografia, uma para aminoácidos neutros e ácidos e outra para aminoácidos básicos. O reconhecimento do aminoácido em uma análise é feito pela sua posição de eluição e a sua quantificação é feita com base na altura do pico (picos finos) ou área de pico (picos mais largos). Atualmente, utiliza-se uma única coluna de cromatografia e técnicas de detecção muito sensíveis, o que permite uma análise rápida na faixa dos nanomoles ou picomoles.

A *Figura V-15* mostra a separação de uma mistura de aminoácidos padrões encontrados nos hidrolisados de proteínas (MURREN e col).

ABSORVÂNCIA

TEMPO (min.)

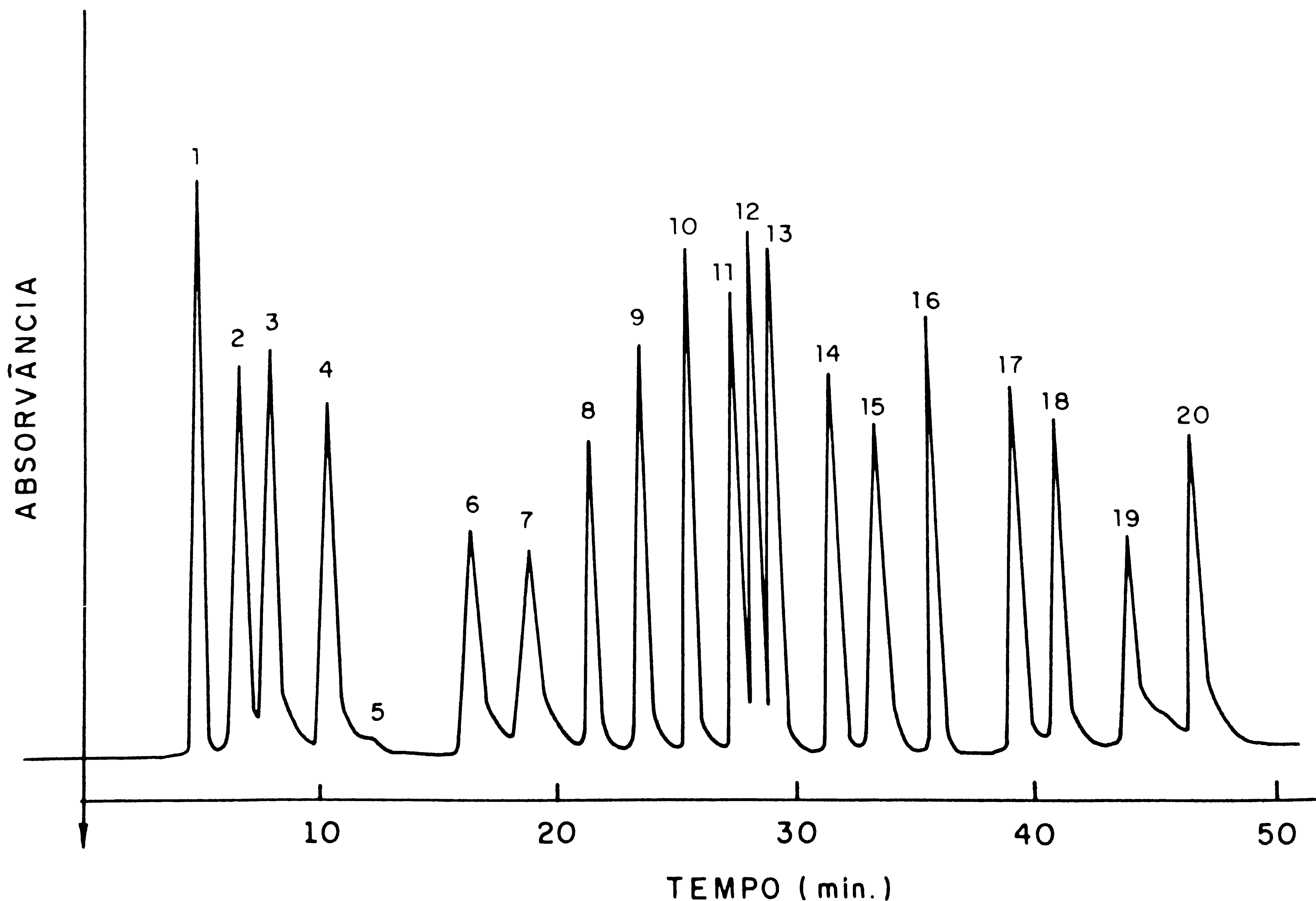



FIGURA V-15 Separação de aminoácidos protéicos utilizando uma coluna (35 x 0,26 cm) com partículas de 7 μm e eluída a 9,6 mL/h com gradiente de pH produzido por tampões citrato-borato. Amostra 1: ác. aspártico; 2: treonina; 3: serina; 4: ác. glutâmico; 5: prolina; 6: glicina; 7: alanina; 8: cisteína; 9: valina; 10: metionina; 11: isoleucina; 12: leucina; 13: norleucina; 14: tirosina; 15: fenilalanina; 16: histidina; 17: triptofano; 18: lisina; 19: amônia; 20: arginina.

O tempo de análise é inferior a uma hora sendo utilizada uma coluna contendo uma resina com partículas de 7μ m (Rank Hilger) e eluída com um gradiente de pH produzido com tampões citrato-borato a uma vazão de 9,6 mL/h a 60 °C. Nestas condições a pressão da coluna alcança a faixa de 20 a 30 bar.

O autoanalisador tem sido também utilizado para a determinação de hormônio-peptídeos como a angiotensina I, a angiotensina II, a bradicinina, o LH-RH e outros (GREENE e col., SPADARO e col.). A *Figura V-16* mostra a separação da angiotensina I, a angiotensina II e alguns peptídeos e aminoácidos relativos, obtida em um autoanalisador. A coluna de 15 x 0,9 cm, contendo Aminex A-5, foi eluída com tampão citrato a um vazão de 60 mL/h.

Atualmente , muitas destas aplicações são realizadas através da utilização de CLAE, empregando-se resinas compatíveis com esta técnica de separação.

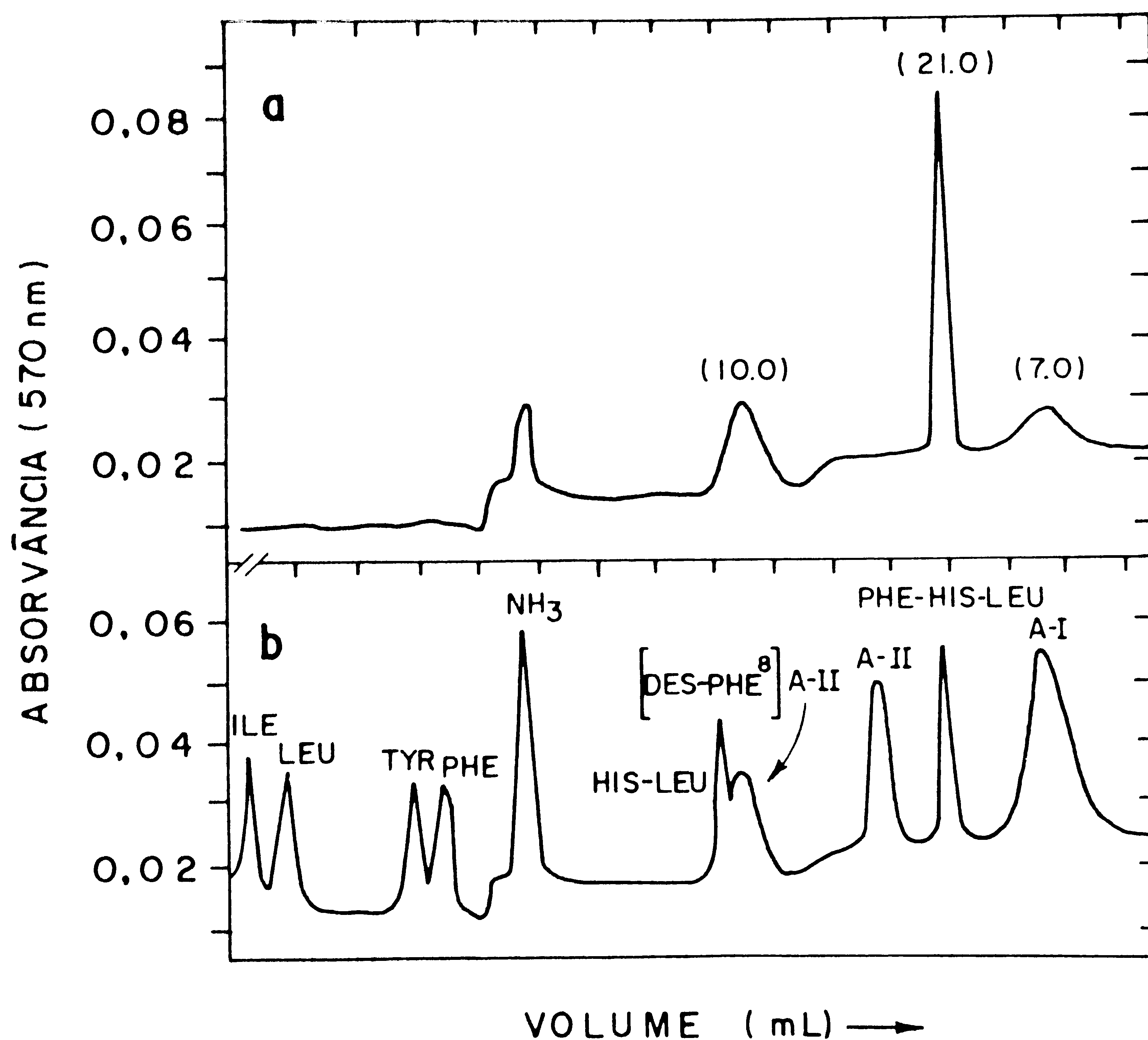



FIGURA V-16 Separação de angiotensina I, angiotensina II e alguns peptídeos e aminoácidos relacionados. a: ação de uma enzima na angiotensina I, resultando em dois fragmentos peptídicos, que podem ser identificados pelo cromatograma padrão. b: A-I: angiotensina I, A-II: angiotensina II.

9. REFERÊNCIAS

- BOCK, R.M. e LING, N.S. *Anal. Chem.*, *26*, 1543 (1954).
- BRISTOW, P.A. *L.C. in Practice*, hetp., Macclesfield, U.K., 1976.
- COOPER, T.G. *The tools of Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, capítulo 4, 1977.

- FLECTHER, L.; RIDER, C.C. e TAYLOR, C.B. *Biochim. Biophys Acta*, *452*, 245 (1976).
- FRITZ, J.S.; GJERDE, D.T. e POHLANDT, C. *Ion Chromatography*, Dr. Alfred Huthig Verlog Gmbh, Heidelberg, 1982.
- FRITZ, J.S. e RETTING, T.A. *Anal. Chem.*, *34*, 1562 (1962).
- GRANDE, J.A. e BEUKENKAMP, J. *Anal. Chem.*, *28*, 1497 (1956).
- GREENE, L.J.; SPADARO, A.C.C.; MARTINS, A.R.; PERUSSI DE JESUS, W.D. e CAMARGO, A.C.M. *Hypertension*, *4*, 178 (1982).
- GRIMSMAW, R.W. e HARLAND, C.E. *Ion-Exchange: Introduction to Theory and Practice*, The Chemical Society, Londres, 1975.
- GUENTHER, W.B. *Química Quantitativa*, Edgard Blucher Ltda., São Paulo, capítulo 23, 1972.
- HORWITZ, E.P.; DELPHIN, W.H.; BLOOMQUIST, C.A.A. e WANDEGRIFT, G.F. *J. Chromatogr.*, *125*, 203 (1976).
- KETELLE, B.H. e BOYD, G.E. *J. Am. Chem. Soc.*, *73*, 1862 (1951).
- KHYM, J.X. *Analytical Ion Exchange Procedures in Chemistry and Biology-Theory, Equipment and Techniques*, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1974.
- KRAUS, K.A. e MOORE, G.E. *J. Am. Chem. Soc.*, *75*, 1460 (1953)
- KRESSMAN, T.R.E. *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry*, Interscience Publishers, Inc., New York, capítulo 1, 1957.
- MOORE, S. e STEIN, W.H. *J. Biol. Chem.*, *192*, 663 (1951).
- MORRIS, C.J.O.R. e MORRIS, P. *Separation Methods in Biochemistry*, Sir Isaac Pitman & Sons ltd., capítulo 8, 1964.
- MURREN, C.; STELLING, D. e FELSTEAD, G. *J. Chromatogr.*, *115*, 263 (1975).
- PETERSON, E.A. *Cellulosic Ion Exchangers*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London, 1970.
- POLSON, A. *Biochem. Biophys. Acta*, *50*, 565 (1961).
- PORATH, J.; JANSON, J.C. e LAAS, T. *J. Chromatog.*, *60*, 167 (1971).
- SNYDER, L.R. e KIRKLAND, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª edição, John Wiley & Sons, Inc., capítulo 10, 1979.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. E MOORE, S. *Anal. Chem.*, *30*, 1190 (1958).
- SPADARO, A.C.C.; MARTINS, A.R.; BERTI, J.D. e GREENE, L.J. *Anal. Biochem.*, *91*, 40 (1978).

CAPÍTULO VI

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

Zuleika Rothschild
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia por exclusão promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, e dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado. Entre outros usos, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros como, por exemplo, proteínas, tendo densidade e formas semelhantes, pode fornecer um método rápido e útil de determinar a massa molecular e a forma destas macromoléculas. Este tipo de cromatografia é também conhecido com os nomes de filtração em gel, permeação em gel, ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita. Neste capítulo será usado o termo cromatografia por exclusão, de acordo com o indicado no Capítulo I.

A cromatografia por exclusão tem propriedades desejáveis, tais como: simplicidade técnica, insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e versatilidade pois é possível separar substâncias com massas moleculares abaixo de 1000 ou de vários milhões, variando a matriz do gel.

A propriedade que distingue a cromatografia por exclusão, introduzida mais ou menos em 1960, de outros tipos de cromatografia é que o recheio ou gel é constituído de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis. As partículas estacionárias compõem um gel, não carregado, inchado com o mesmo líquido que carrega as substâncias a serem separadas.

O espaço entre as partículas é ocupado pelo líquido que flui pelo material levando, ou não, as substâncias a serem separadas. O caráter da fase estacionária controla o movimento das substâncias, variando suas velocidades e assim promovendo a separação,

A distribuição das substâncias entre a fase móvel e a fase estacionária contendo líquido afeta a velocidade. Uma molécula dentro da fase estacionária não se move na direção do fluxo líquido, pois este se dá entre as partículas; não há fluxo maciço de líquido através das partículas. A velocidade de passagem do soluto pelo recheio depende do tempo médio que as moléculas passam no líquido dentro do gel.

De modo geral, existe uma correlação entre o volume no qual a substância é eluída e seu tamanho molecular ou sua massa molecular. O modelo simples de FLODIN para cromatografia por exclusão explica esta relação; segundo ele, a distribuição líquido-gel depende de efeitos estéricos; a partícula (estacionária) com suas ligações cruzadas ocupa um espaço grande e intrincado ao qual só têm acesso moléculas pequenas fazendo com que haja uma distribuição homogênea entre o líquido e o gel. Para moléculas maiores este acesso é muito mais difícil e a distribuição é favorecida em relação ao líquido. Isto induz moléculas grandes a emergir da coluna mais cedo do que as pequenas *(Figura VI-1)*

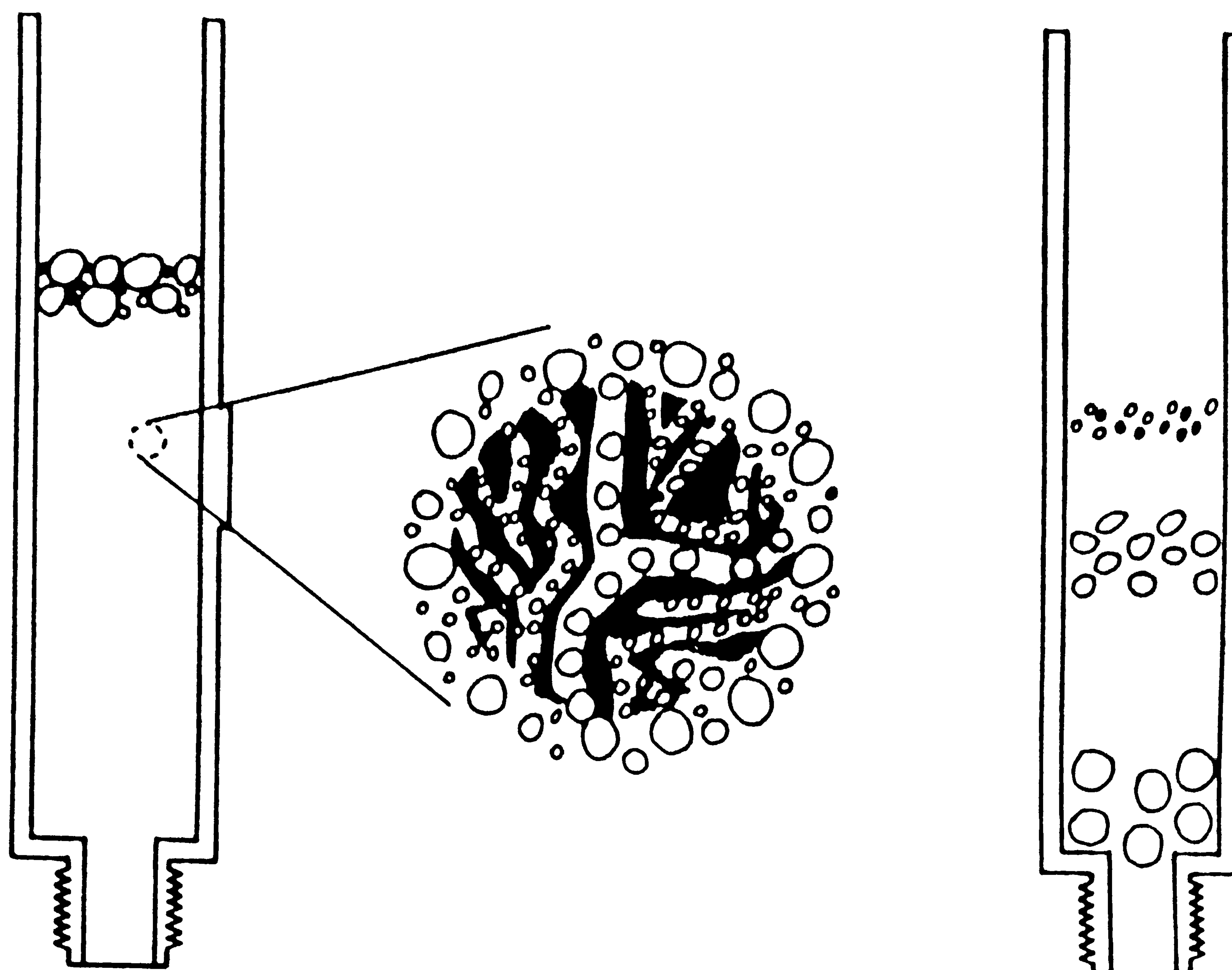



FIGURA VI-1 Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão.

2. CONCEITOS QUE CARACTERIZAM A CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

Alguns conceitos devem ser discutidos mais profundamente para evitar erros e/ou ambigüidades.

2.1. Fases

Como descrito na introdução, em cromatografia por exclusão usa-se um suporte que não é realmente a fase estacionária; o gel ou similar apenas fornece os poros onde se dá o mecanismo de distribuição; esta distribuição é a do soluto entre a fase móvel dentro e fora dos poros.

Assim devemos considerar:

a. o volume da matriz do gel ou similar: V_g ;

b. o volume da fase móvel "estacionária", intra-gel, ou dentro dos poros: Vi (não confundir com Vs que é o volume da fase estacionária na teoria geral de cromatografia);

c. volume intersticial ou volume da fase móvel fluindo entre as partículas do gel,fora dos poros: Vo; pode ser determinado por uma substância de alta massa molecular que não é retardada porque é completamente excluída pelo gel;

d. volume total da coluna: $V_c = V_o + V_i + V_g$;

e. volume total da fase móvel, V_t, inter e intrasticial, sem o volume do suporte: $V_t = V_o + V_i$.

2.2. Eluição

Eluição é a separação seqüencial ou concomitante de uma ou várias substâncias pela passagem de fase móvel adequada, que é o eluente. O sucesso do processo cromatográfico depende, entre outras coisas, do comportamento dos solutos e das características destes e da fase móvel dentro da coluna.

A vazão do líquido através do recheio é medida em mL/min ou mL/s. Para efeito de comparação de experimentos é expressa por unidade da área da base da coluna cromatográfica, $mL\ hr^{-1}\ cm^{-2}$. A manutenção da vazão é feita por uma bomba ou pela diferença de nível entre a entrada e saída do líquido eluente; define-se então um parâmetro controlador que é a pressão operacional, aquela necessária para sobrepujar a resistência à vazão através do recheio. A montagem das colunas e reservatórios de eluentes pode ser feita obedecendo princípios simples de física; são obtidos assim condições variáveis de eluição sem extremos que possam afetar o gel. Discussão detalhada destes parâmetros foge ao escopo desta publicação, e poderá ser encontrada em literatura especializada.

Durante uma separação cromatográfica, a concentração das substâncias separadas pode ser determinada no líquido por diferentes métodos. A relação entre a concentração da substância e o volume na qual ela é coletada pode ser determinada por projeção dos dados correspondentes; a relação caracteriza o comportamento dos diferentes solutos. Assim, V_R , o volume de retenção, é o volume de eluente, que carrega as moléculas da substância através da coluna. A medida deste volume pode ser feita de várias formas que serão vistas em alguns exemplos.

A relação V_R/V_o é o volume relativo de eluição com valores ≥ 1. O inverso, V_o/V_R , é o coeficiente de retenção ou mobilidade relativa. A medida de V_R é dada por:

$$V_R = V_o + K_o V_i$$

onde K_o é o coeficiente de distribuição ou exclusão e é a relação entre as concentrações de soluto na fase estacionária (líquido intrasticial) e a fase móvel (líquido intersticial).

A razão de distribuição das massas, k', relaciona o tempo durante o qual as moléculas que penetram ou não nos poros percorrem a coluna.

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o} = \frac{V_R - V_o}{V_o} = \frac{1 - R}{R}$$

onde R, a mobilidade relativa, é determinada por:

$$R = V_o / V_R .$$

Assim,

$$K_o = k'\beta ,$$

onde β é a razão das fases, V_o / V_i .

O coeficiente de distribuição, K_o , pode ser caracterizado de várias maneiras:

a. A fase estacionária é só o líquido embebido no gel, então:

$$K_o = \frac{V_R - V_o}{V_i}$$

b. Se toda fase de gel necessita ser considerada a fase estacionária, porque é difícil medir V_i , a constante de distribuição é Kav, e é expressa:

$$Kav = \frac{V_R - V_o}{V_t - V_o} = \frac{V_R - V_o}{V_i + V_g} = \frac{V_R - V_o}{V_x}$$

onde $V_x = V_g + V_i$.

Verifica-se na prática que para uma série de compostos com moléculas de formas e densidades similares, existe uma relação sigmóide entre os valores de Kav e o logaritmo de suas massas moleculares (log PM). Curvas de calibração construídas desta maneira para um tipo específico de gel são às vezes chamadas curvas de seletividade; estas demonstram que em um intervalo razoável existe uma relação linear entre Kav e o log PM que é de grande utilidade *(Figura VI-2).*

Pela retenção do soluto na fase estacionária, cada zona se movimenta com uma velocidade característica, a mobilidade relativa, que é uma fração R da vazão F_c da fase móvel. Assim, a velocidade de zona é R x F_c. O R varia para o soluto e a coluna; R também é a probabilidade da molécula estar na fase móvel. Apesar da zona parecer migrar em conjunto, no nível molecular, o processo se dá em etapas, cada molécula de soluto se movimenta em uma seqüência de parada-movimento. Cada vez que a molécula se afixa na fase estacionária seu movimento se interrompe. Assim, a velocidade de migração de uma simples molécula depende da fração média de tempo que ela permanece na fase móvel. Se as moléculas gastam uma fração R de seu tempo na fase móvel, as moléculas, e portanto, a zona se movem com a mesma velocidade, R x F_c. Isso significa a mobilidade relativa em termos moleculares. A zona cromatográfica contém grande número de moléculas; a fração média de tempo que cada molécula fica na fase móvel é proporcional ao número total de moléculas nesta fase. Inversamente, a fração média de tempo gasto por cada molécula na fase estacionária (que é 1 - R) é também proporcional ao número de moléculas nesta fase.

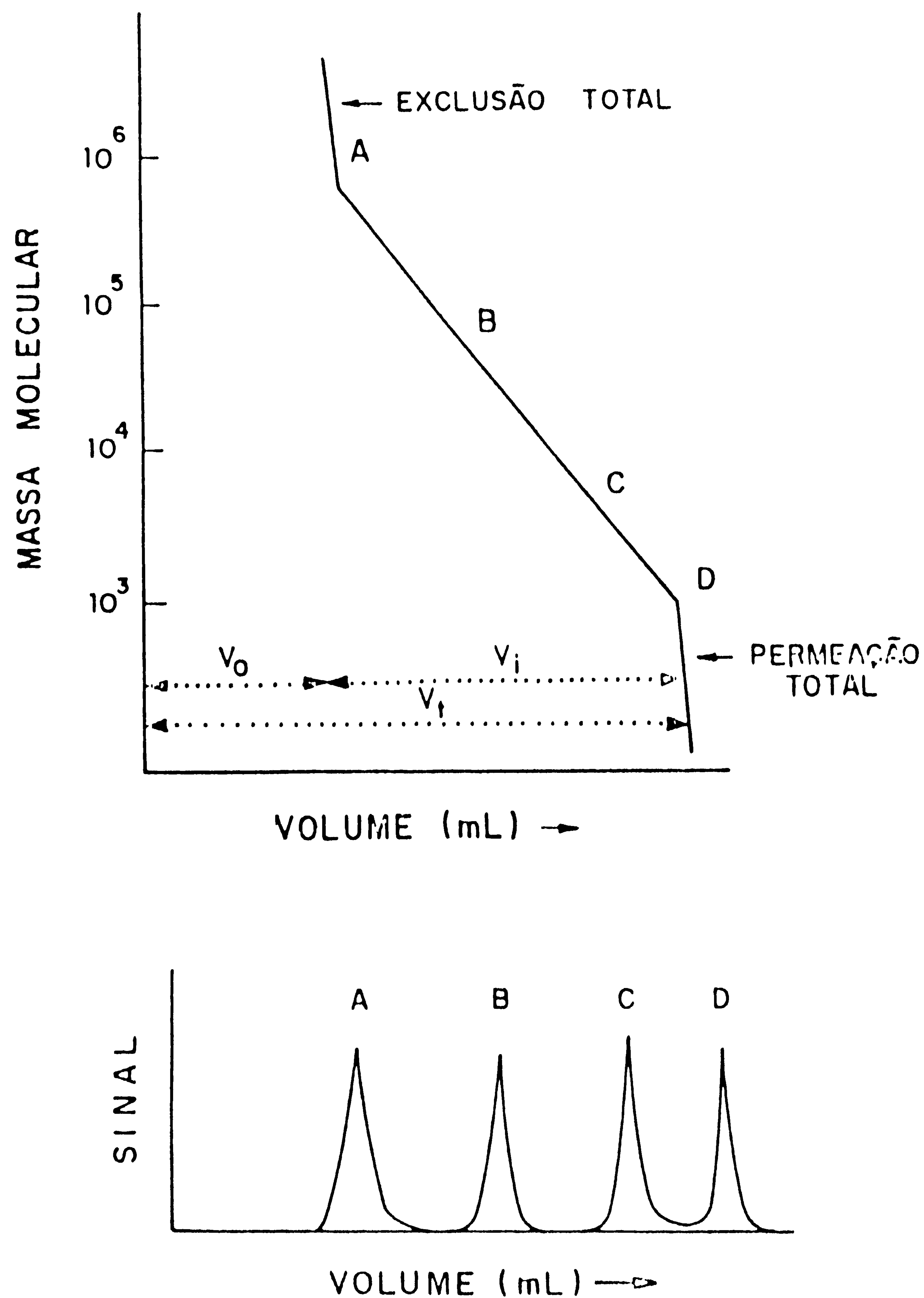



FIGURA VI-2 Relação entre massa molecular e tempos de retenção em cromatografia por exclusão. Alguns parâmetros que caracterizam as posições de eluição.

2.3. Espalhamento da zona e resolução

O sucesso de um processo cromatográfico depende não só da eficiência como da resolução. Imagine o seguinte experimento:

Uma coluna contendo um recheio com um detector de soluto (por ex., um espectrofotômetro) no começo e no fim da coluna. O detector mede a concentração do soluto que é registrada. No tempo 0 injeta-se uma quantidade de soluto (1 g/mL). O detector no começo da coluna dará uma resposta rápida, não espalhada. Em seguida, passa-se à fase móvel pura; após a passagem de certo volume, o detector da saída começa a indicar o soluto e o traçado obtido tem a forma de sino. O volume de eluição, V_R, é medido a partir da metade da resposta rápida da entrada da coluna até a mesma posição do pico no traçado de saída.

Se o soluto tivesse um coeficiente de distribuição igual a zero, então, $V_R = V_0$. A eluição do soluto se dando na forma de sino, indica que a zona se espalhou e se tornou diluída na passagem através da coluna. Esse fenômeno é chamado espalhamento de zona, e é de importância em cromatografia. Para entender-se isso considere o seguinte exemplo numérico: uma coluna ou "prato" tem diâmetro de 1,0 cm e altura de 0,76 cm. O volume total é 0,6 mL. Vamos cromatografar uma amostra de soluto puro, cujo coeficiente de partição, K_0, é 0,5. O soluto, 1 g em 0,4 mL, é introduzido na coluna. Após um equilíbrio 0,67 g ficarão na fase móvel e 0,33 g na fase estacionária. Note que, apesar da concentração do soluto na fase móvel ser somente metade da fase estacionária, o volume da fase móvel é 4 vezes maior do que o da fase estacionária. Conseqüentemente, a quantidade de soluto é o dobro. Se rapidamente introduzirmos 0,4 mL de solvente puro, todo o soluto da fase móvel é eluído deixando 0,33 g do soluto no "prato" em questão. Após novo equilíbrio, teremos 0,22 g na fase móvel e 0,11 g na fase estacionária; em uma sucessiva eluição com 0,4 mL de solvente, 0,22 g seriam removidos, ou seja, após cada eluição de 0,4 mL, 2/3 do soluto é eluído.

Imaginando um grande número de tais "pratos" colocados um sobre os outros, o soluto emergirá de um e entrará no outro sucessivamente. Assim, se considerarmos a injeção de 0,4 mL de solvente como uma transferência (transfere todo o soluto da fase móvel de um prato a outro) e calcularmos a quantidade total de soluto em cada fase depois de várias transferências, os valores projetados mostram que a zona cromatográfica, inicialmente confinada a um prato, se espalha à medida que migra para outros pratos e o perfil cromatográfico através da zona desenvolve uma forma de sino que de fato é uma curva de erros normal ou Gaussiana *(Figura VI-3)*. O desvio padrão, Υ, da curva de Gauss, é aproximadamente um quarto da largura total da zona cromatográfica, descrita pelo sino, isto é, $w_b = 4\Upsilon$. Por sua vez, w_b é diretamente proporcional a L, ou seja, a raiz quadrada do comprimento da coluna através da qual a zona atravessa. Entretanto, a distância entre os centros de zonas adjacentes, ΔZ, é diretamente proporcional ao comprimento da coluna, L, isto é:

$$\Upsilon \alpha \sqrt{L} \quad e \quad \Delta Z \; \alpha \; L$$

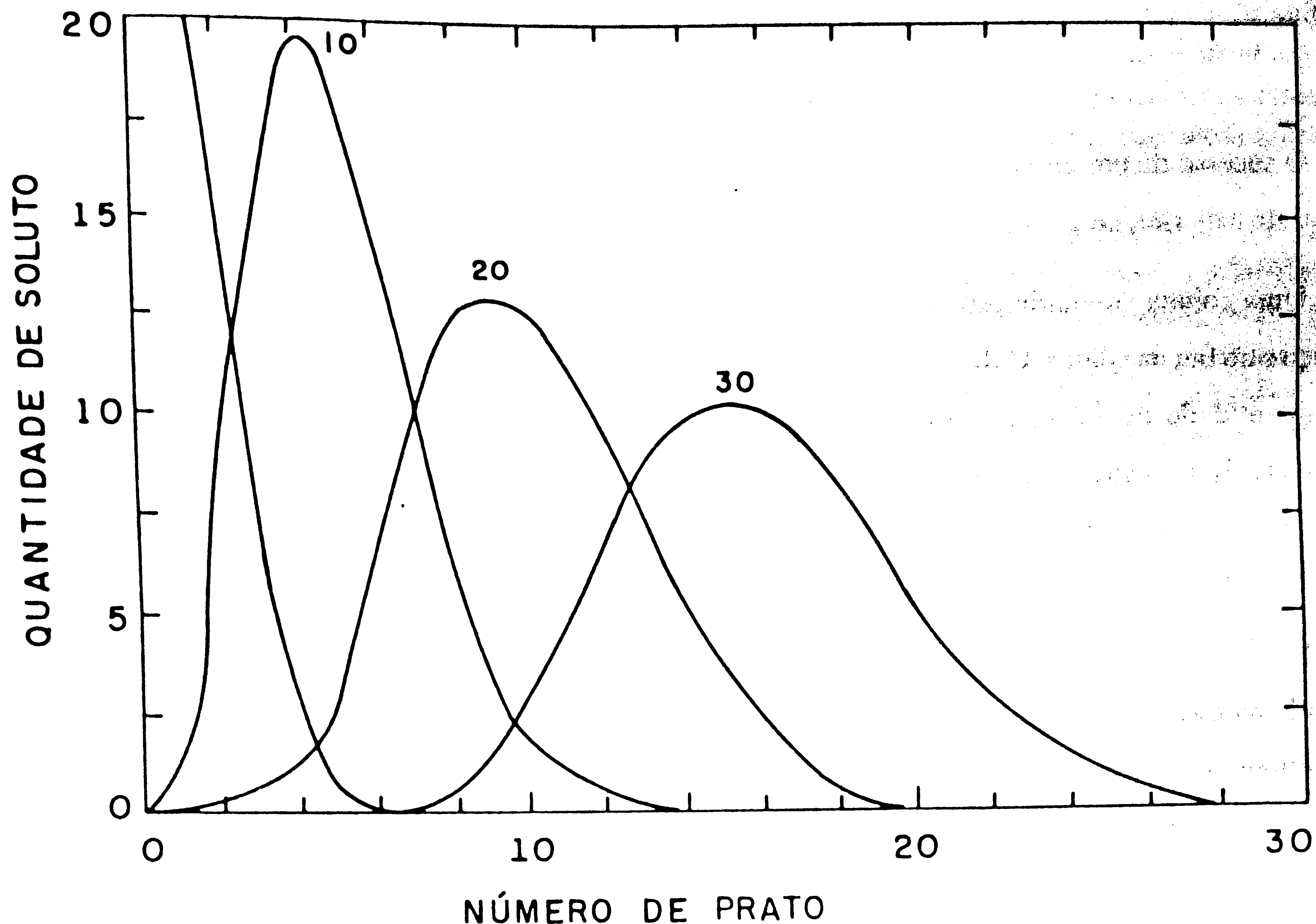



FIGURA VI-3 Espalhamento de zona, considerando que uma coluna cromatográfica é um conjunto de estruturas (pratos) justapostas e que o processo de separação pressupõe uma série de equilíbrios e transferências. O algoritmo acima dos picos indica o número de transferências.

Assim, a separação das zonas ocorre mais rapidamente do que o espalhamento da zona. Este fato leva à conclusão que, mesmo com valores de R ligeiramente diferentes, qualquer par de solutos pode ser separado em qualquer coluna cromatográfica, contanto que esta seja suficientemente longa. Grandes diferenças nos valores de R podem encurtar o comprimento da coluna.

A resolução, R_s, é expressa pela relação:

$$R_s = \frac{\Delta Z}{4\Upsilon} = \frac{\Delta V_R,}{w_b}$$

e é igual ou menor que 1 quando dois solutos são quase inseparáveis. Ela depende de muitos fatores, incluindo o volume da amostra, velocidade de eluição, altura, área e qualidade do recheio da coluna.

O espalhamento de zona tem três causas:

a. a cinética de adsorção-desorpção contribui significativamente para o espalhamento;

b. a difusão molecular na direção do fluxo é apreciável em vazões baixas;

c. a formação de canais e difusão turbilhonar são muitas vezes fatores significativos.

Com a introdução destes conceitos, conclui-se que cromatografia por exclusão é um tipo de cromatografia por partição, exceto que a fase estacionária é quimicamente idêntica à fase móvel; o solvente está associado a partículas porosas, que formam um gel. A retenção do soluto depende do seu tamanho. Se

a menor dimensão da molécula de soluto é maior do que o maior poro da partícula de gel, o soluto é completamente excluído da fase estacionária, K_o = 0 e R = 1. Se as moléculas de soluto são muito menores do que o diâmetro dos poros, a concentração de soluto nas fases móveis e estacionárias são iguais ou K_o = 1. Portanto, cromatografia por exclusão é diferente das outras formas , porque nesta o K_o só pode variar de zero a unidade.

2.4. Outros conceitos muito usados em cromatografia por exclusão

A **retenção de água** é a quantidade de água retida pelo gel ao inchar. Deve-se ressaltar que não inclui o solvente entre as partículas e é expressa em mL/g de gel seco.

O **limite de exclusão** é a massa molecular da menor molécula que é incapaz de penetrar qualquer dos poros da matriz.

O intervalo de fracionamento se extende da massa molecular do soluto que é eluído em volume perto do total do recheio, isto é, $K_o \cong = 1$ e $V_R \cong V_c - V_g \cong V_o + V_i$ até a massa molecular do soluto, que é completamente excluído do gel, isto é, $K_o = 0$ e $V_R = V_o$.

O tamanho da partícula influencia o grau de alargamento da zona de eluição, a resolução, a diluição e a vazão que pode ser obtida. Partículas grandes de gel permitem uma alta vazão, mas resolução limitada. Pequenas partículas diminuem a vazão, especialmente quando os poros são grandes, mas permitem alta resolução. Conseqüentemente, partículas de tamanhos intermediários, como malha de 100 a 200, são geralmente empregadas. Para cada produto existe uma combinação adequada para o tamanho dos poros, limite de exclusão, ganho em água e vazão.

3. RECHEIOS USADOS EM CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

3.1. Características da fase estacionária

O termo "gel" infere material elástico, contendo água. Em termos técnicos é uma estrutura tridimencional cuja estabilidade mecânica é dada pelo material contendo ligações cruzadas. Os espaços não ocupados pelo material contêm líquido. Muitas substâncias naturais podem formar géis: polissacarídeos de frutas e raízes, proteínas, silicatos inorgânicos e fosfatos. A combinação adequada deste com um formador de ligações cruzadas pode dar um gel em presença de solvente compatível. Quando o líquido é retirado (secagem) e/ou adicionado de novo, nem sempre o gel volta ao seu estado inicial.

A microestrutura do gel pode ser homogênea ou heterogênea. No primeiro caso, o gel tem propriedades que indicam uma distribuição homogênea de matriz através do corpo do gel. Estes géis são usualmente mais moles, e podem perder ou absorver o líquido e permitem a entrada de moléculas de pequeno peso molecular. Os géis de estrutura não homogênea têm regiões de grande concentração de matriz e outras quase vazias; esta estrutura com espaços grandes permite a entrada de moléculas maiores.

Um gel adequado à cromatografia precisa ter algumas características, indicadas a seguir.

3.1.1. Inércia Química

Uma interação química entre a matriz e o soluto pode levar a uma ligação irreversível entre os dois ou à desnaturação de substâncias lábeis. Em bioquímica esta última possibilidade é muito comum.

Interações fracas e reversíveis entre o soluto e a matriz originam volumes de retenção maiores daqueles esperados, levando em consideração a massa molecular das substâncias a serem separadas. Entretanto, este fato, em geral, não causará desvios apreciáveis e em alguns casos pode até melhorar a separação.

3.1.2. Estabilidade

O gel deve suportar uso contínuo quando mantido em condições brandas de pH e temperatura.

3.1.3. Baixo teor de íons

Grupos carregados interferem no rendimento de baixas concentrações de espécies iônicas cromatografadas e produzem picos assimétricos, especialmente se a cromatografia for feita em baixa força iônica.

3.2. Natureza química do gel

O gel quimicamente definido, de modo geral, deve permitir variações para o fracionamento em diferentes intervalos de massa molecular. Para os microrreticulares o intervalo de fracionamento é determinado pelo inchamento que, por sua vez, depende da quantidade maior ou menor de matriz. Variando o conteúdo da matriz de 50% a 5% (p/v) em água, o limite de exclusão varia de massa molecular 1000 a 500000. Para géis macrorreticulares, a estrutura do gel também é importante. Eles podem ser fabricados com a mesma quantidade de matriz mas com propriedades variáveis.

3.3. Natureza física do gel

O gel deve conter partículas de tamanho e distribuição controlados. Partículas pequenas dão melhor resolução e eficiência. O aumento do tamanho das partículas resulta em espalhamento da zona. De outro lado, a resistência ao fluxo é maior em uma coluna com partículas pequenas. Para isso deve-se associar as melhores condições de fluxo à melhor resistência e estabelecer condições médias. Não é possível obter material totalmente homogêneo quanto ao tamanho de partículas, mas a distribuição deve ser a mais estreita possível. Em situações especiais é possível melhorar a distribuição dos materiais do comércio com procedimentos seletivos. De maneira geral os géis são fabricados na forma de pérolas que facilitam o fluxo.

O gel deve ter rigidez mecânica para não ser deformado pelas forças causadas pelo fluxo do líquido através da coluna. Géis com pequeno conteúdo de matriz e, portanto, alto limite de exclusão, tendem a ser mecanicamente fracos; isto limita o trabalho com substâncias de alta massa molecular.

3.4. Tipos de gel

3.4.1. Géis de dextrano (Sephadex)

Este tipo foi um dos primeiros estudados sistematicamente; tem boas propriedades cromatográficas e tem mantido a sua liderança inicial. É um polissacarídeo com unidades de glicose, obtido por fermentação de sacarose. As ligações são do tipo α -1-6 e as ramificações podem variar entre 1-2, 1-3 e 1-4 (*Figura VI-4*). Apesar dos dextranos serem solúveis em água, o tratamento com substâncias que produzem ligações cruzadas nas cadeias polissacarídicas fornece um material que, em contato com água, incha e produz um gel com estrutura tridimensional. O grau de inchamento é decorrente do índice de ligações cruzadas e das condições das reações em que se formaram as ligações.

O material fabricado por Pharmacia AB, Uppsala, Suécia, com nome de Sephadex, representa um marco na história da cromatografia. É um material muito estável quimicamente, apesar de conter ligações glicosídicas que são susceptíveis ao ataque ácido. Sephadex é vendido em oito tipos diferentes com vários graus de ligações cruzadas e propriedades de entumescimento. Os diferentes tipos são caracterizados pela letra G seguida de um número que representa o número de mL de água absorvidos por 1g do gel x 10 (por ex., G-50). Diferentes diâmetros de partícula para cada G-número se referem a partícula seca. Para o diâmetro de partícula entumescida deve-se levar em conta outros fatores. Relações entre massa molecular e propriedades de eluição foram inicialmente estabelecidas para géis de dextranos (Sephadex). O comportamento depende do tipo de substâncias. A *Figura VI-2* mostra as relações quando se considera volume de retenção, V_R , versus log da massa molecular ou Kav versus massa molecular. Para fracionar proteínas com massa molecular acima de 10000 deve-se usar géis que absorvem 7,5 a 20 g de água ou seja entre Sephadex G-75 e Sephadex G-200. Para fracionamento de peptídeos e separações de grupo, como dessalificação, deve-se usar Sephadex G-10 a Sephadex G-50.

3.4.2. Géis de poliacrilamida (Bio-Gel)

O uso de poliacrilamida na forma de gel para cromatografia foi proposto em 1962. Acrilamida, $H_2C=CH\text{-}CO\text{-}NH_2$, é solúvel em água e insolúvel em solventes não polares. Este composto pode ser polimerizado com metileno-bis acrilamida, $H_2C=CH\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}CO\text{-}CH=CH_2$, dando poliacrilamida com ligações cruzadas entre as cadeias. A mistura de reação pode ser induzida a formar um gel cujas propriedades cromatográficas e de retenção de água vão depender da quantidade de monômero presente e da proporção do formador de ligações cruzadas. Este produto é fabricado pela firma Bio-Rad Laboratories dos Estados Unidos e vendido como Bio-Gel e se apresenta na forma de pó seco com estrutura de pérolas. A matriz perde e ganha água espontaneamente; é inerte e sua ligação química sensível é o grupo amida que pode ser hidrolizada dando uma carboxila que introduziria algumas propriedades de troca iônica ao sistema. Entretanto, o fabriacante indica estabilidade entre pH 2 e 11. As matrizes Bio-Gel se caracterizam pela letra P, seguida de um número que indica limite de exclusão para o gel, considerando proteínas globulares ou peptídeos em unidades de 1000. Para Bio-Gel P-300 haveria um limite de exclusão de 300000. As propriedades de fracionamento deste gel parecem ser semelhantes as do tipo Sephadex. Intervalos de fracionamento são semelhantes para tipos que apresentam o mesmo grau de absorção de água. Também são semelhantes as propriedades de resistência à pressão. As partículas de Bio-Gel P-300 (alto ganho de peso de água) são tão "moles" que causam dificuldades técnicas.

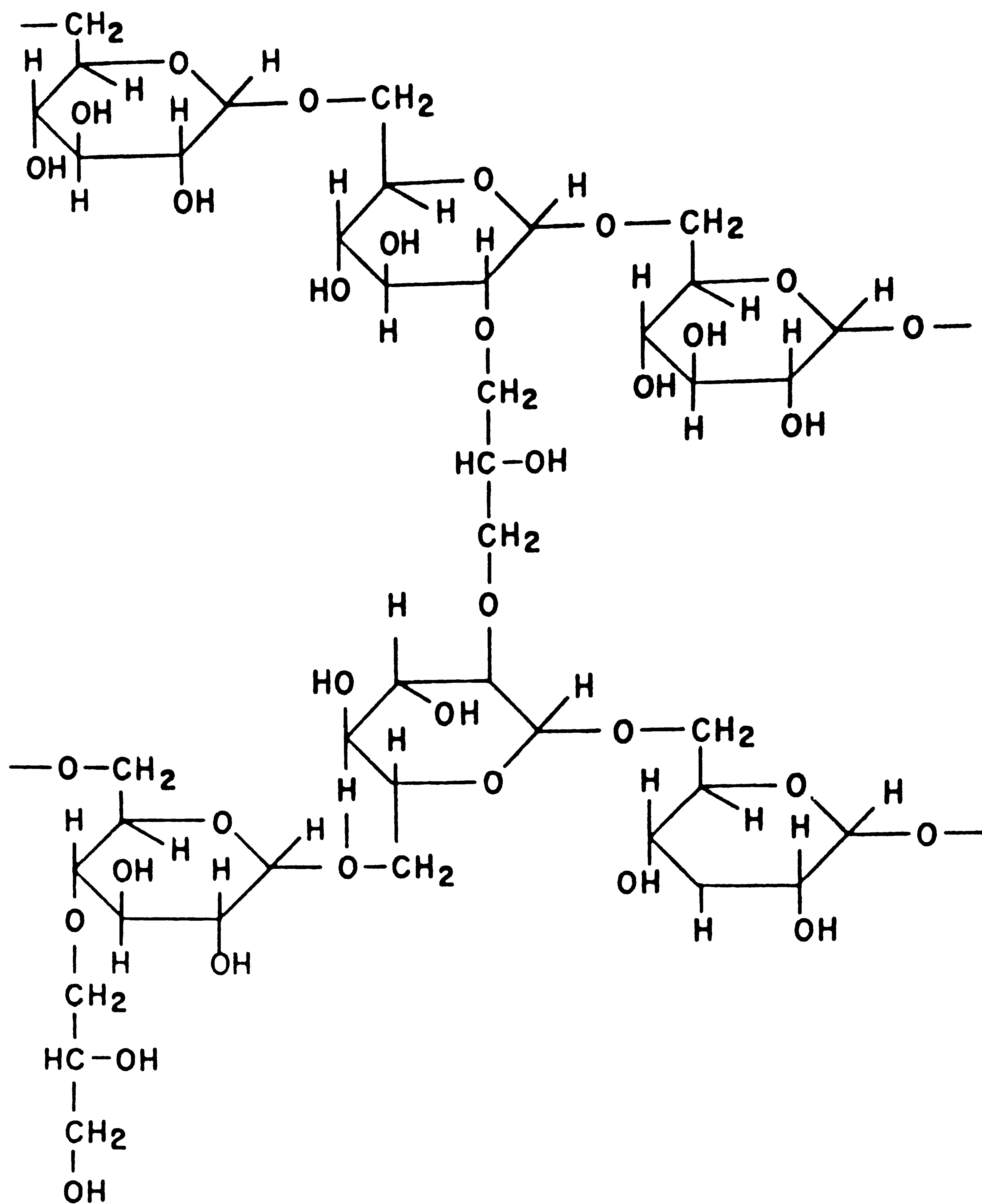



FIGURA VI-4 Estrutura parcial de Sephadex.

3.4.3. Géis de agar e agarose

As propriedades cromatográficas do agar foram estudadas por POLSON em 1961. Elas demonstraram serem boas para alta massa molecular com a vantagem de estabilidade mecânica. Estas propriedades fazem com que os géis de agar sejam um complemento aos géis de dextrano e poliacrilamida. Géis de agar para as menores massas moleculares correspondem aproximadamente aos dextranos e poliacrilamidas que fracionam as maiores massas moleculares. De outro lado, géis de agar fracionam no limite entre moléculas e partículas. Agar é obtido de algas e se constitui de polissacarídeos lineares de lactose e dioxy-L-galactose. É uma substância usada para inúmeros outros fins e métodos. As macromoléculas na matriz do gel não são ligadas entre si por ligações covalentes. Entretanto, somente ligações por pontes de hidrogênio não explicam a sua estabilidade frente a substâncias que interferem neste tipo de ligação. Considera-se que o tamanho dos poros do gel de agar e sua estabilidade sejam conseqüência da formação de microcristais.

Agar tem certo número de grupos carregados negativamente, sulfatos e/ou carboxilas. Por esta razão é preciso realizar os experimentos com alta força iônica para minimizar os efeitos de troca iônica no processo cromatográfico. Um componente do agar, agarose *(Figura VI-5)*, pode ser separado e usado para a cromatografia sem o inconveniente acima. A fração contendo as cargas é denominada agaropectina e já em 1956 se publicavam métodos para separá-la da agarose. Tanto agar como agarose, não tendo cadeias quimicamente ligadas, são menos estáveis quimicamente e sensíveis à temperatura. Ambos fundem acima de 50°C. Os géis são relativamente estáveis à uréia e não são afetados por acetona ou etanol. Não é possível secar e re-hidratar estes géis; deve-se mantê-los como gel em condições onde não há contaminação bacteriana.

HO CH₂OH O O O HO O HO O O

~ 45°C
~ 100°C
~ 100°C

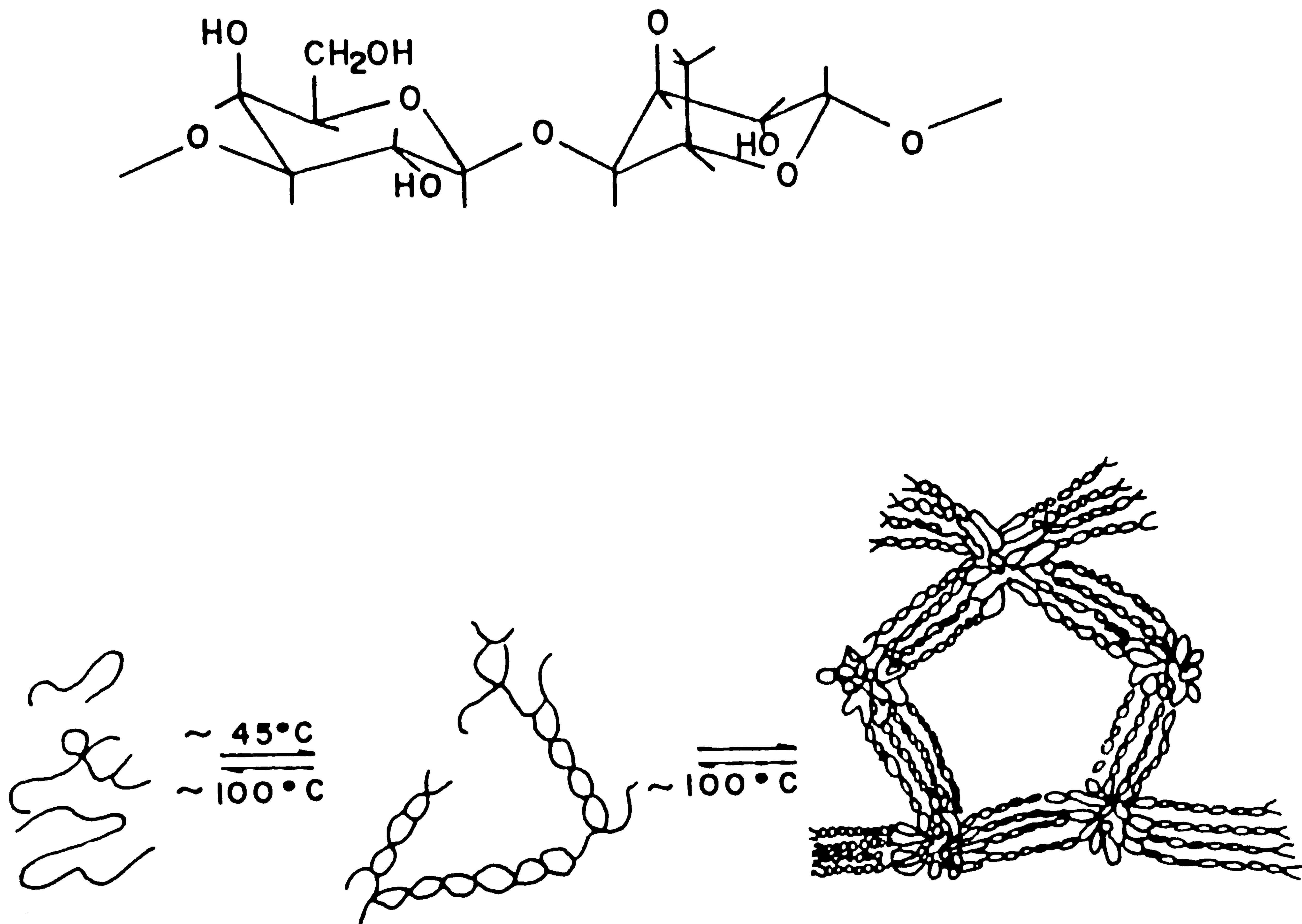



FIGURA VI-5 Estrutura parcial de agarose. Formação do gel de agarose.

Existem quatro tipos de géis de agarose no mercado; Sagavac (Seravac Laboratories), Sepharose (Pharmacia), Gelarose (Titex) e Bio-Gel A (Bio-Rad Laboratories). Os mais usados são Sepharose e Bio-Gel A. O primeiro tem três faixas de fracionamento, 2B, 4B e 6B, que correspondem à porcentagem de material seco no gel. Sepharose é produzida em forma de pérolas com diâmetros dentro do intervalo, 45-200 μm *(Figura VI-6)*. Para Bio-Gel A as especificações estão entre A-150 m a A-0,5 m contendo 1, 2, 4, 6, 8 e 10% de agarose no gel, respectivamente.

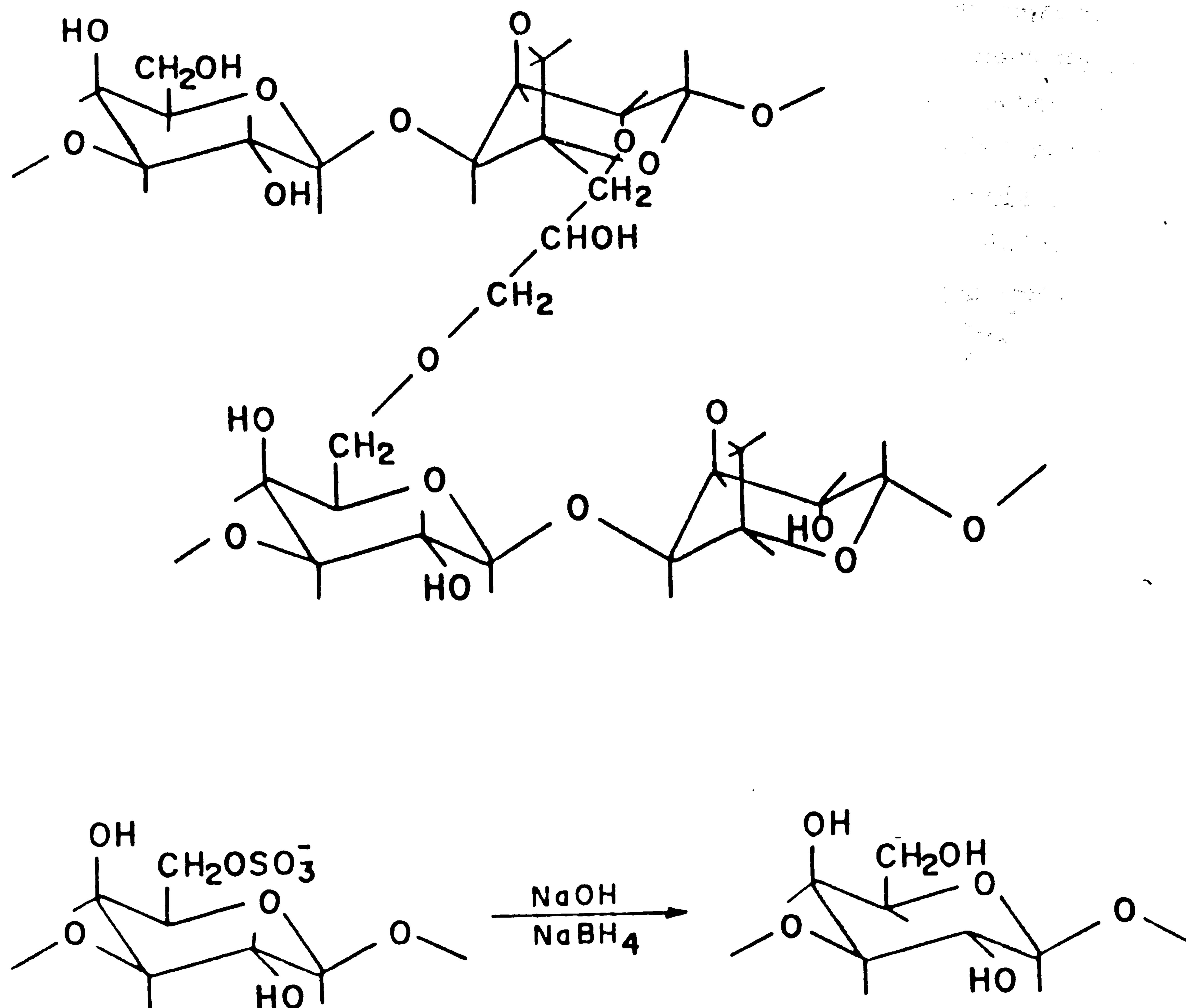
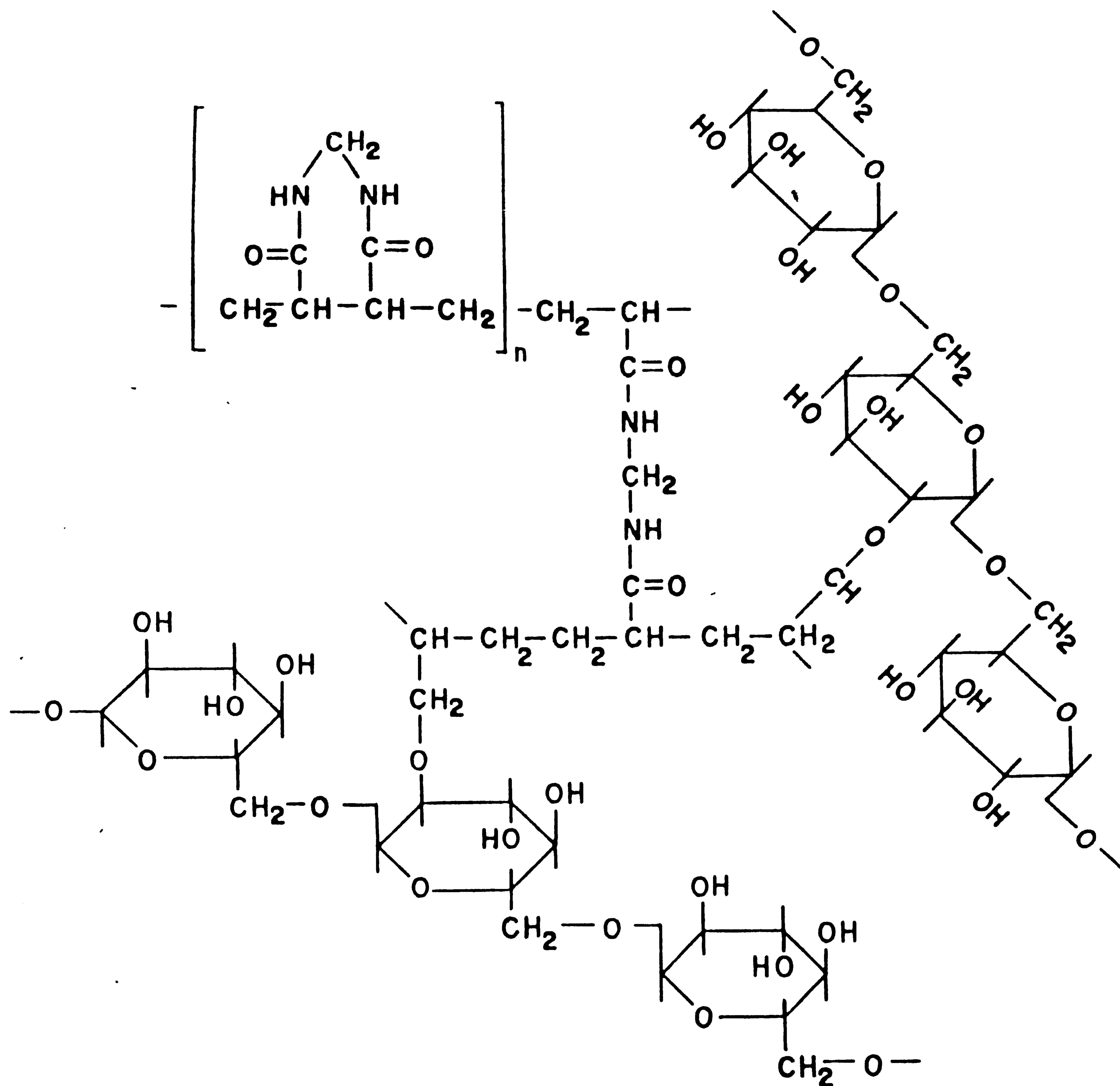



FIGURA VI-6 Estrutura parcial de Sepharose com as ligações entrecruzadas.

3.4.4. Outros géis

A aplicação de métodos químicos trouxe grande progresso neste campo, permitindo a preparação de géis úteis para a separação de compostos de grande massa molecular porém mais resistentes pela presença de ligações cruzadas. Assim a firma Pharmacia sintetizou a Sepharose CL a partir de Sepharose com 2,3 dibromopropanol em meio fortemente alcalino. O produto obtido, além de ter as propriedades do composto original tem maior estabilidade térmica e química. Radicais como sulfato que possam ter permanecido são eliminados por hidrólise alcalina em presença de borohidreto de sódio.

Outro produto que de certa forma combina dextranos e poliacrilamida também foi produzido pela Pharmacia com o nome de Sephacryl. O gel é preparado pela reação entre alil-dextrano com N,N'-metile-nobisacrilamida e proporciona uma estrutura rígida com poros de tamanho controlado *(Figura VI-7)*. Segundo o fabricante, o produto é estável quimicamente em pH 3 a 11 e pode ser autoclavada repetidamente a 120°C em pH 3 sem alteração da estrutura.

Atualmente, a cromatografia por exclusão é capaz de operar com rapidez a altas pressões devido ao desenvolvimento de materiais com poros de tamanho determinado e resistência mecânica a altas pressões. Entre estes destacam-se os géis rígidos do tipo divinilbenzeno (Shodex), que podem ser utilizados para susbstâncias solúveis em solventes orgânicos ou na forma sulfonada para compostos solúveis em água. Este material se apresenta em vários tipos, cobrindo amplos intervalos de massa molecular. Combinando colunas de diferentes intervalos pode-se analisar amostras em uma ampla faixa de massas moleculares.

FUGURA VI-7 Estrutura parcial de Sephacryl.

4. EQUIPAMENTO PARA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

O equipamento necessário para cromatografia varia muito com as finalidades. Experimentos qualitativos para demostração ou em fases preliminares de pesquisa podem ser realizados com equipamento simples. Para situações onde o experimento deve ser cuidadosamente controlado requer-se uma montagem que pode custar altas somas mesmo com um mínimo de peças de equipamento. Faremos uma revisão do estritamente necessário sem esgotarmos as possibilidades.

4.1. Coluna cromatográfica

Qualquer tubo de vidro com diferentes diâmetros internos e/ou comprimento, com uma constricção em uma das pontas, pode ser uma coluna cromatográfica. O bloqueio da saída constrita pode ser feito de maneira temporária com lã de vidro, tela de nylon, com ou sem ajuda de areia ou gel de resina porosa ou bolinhas de vidro. O bloqueio permanente pode ser feito por torneira ou placa porosa de vidro. Nestes casos é muito difícil diminuir o tamanho da câmara pós-bloqueio que se torna uma câmara de mistura dos eluatos. Colunas mais avançadas podem ser adquiridas de várias fontes e apresentam recursos que não só facilitam o trabalho como permitem um ajuste fino do processo. Na maioria dos casos possuem pistões nas partes superior e inferior que facilitam a aplicação da amostra, operações de reciclagem e fluxo de baixo para cima, e facilidade de conexão com o eluente e capilar de saída. Além disto, permite um volume muito pequeno após a saída do material e proteção da superfície inferior e superior do gel. O material no qual a coluna é confeccionada deve ser inerte.

4.2. Controle da vazão da fase móvel

Para o controle por gravidade usa-se um frasco de Mariotte para manter a pressão de operação constante. Este sistema pode ser construído com um recipiente fechado na parte superior e com uma saída na parte inferior que será conectada à coluna. Um tubo aberto é colocado através do gargalo fechado do recipiente até uma determinada altura. A pressão do líquido na extremidade do tubo será então igual a pressão atmosférica externa. Em experimentos de precisão a vazão deve ser mantida por bombas peristálticas ou de pistão, sendo que as primeiras têm uso mais difundido. Variando o calibre dos tubos é possível obter várias vazões com uma bomba peristáltica.

4.3. Registro das curvas de eluição

O material eluído na cromatografia pode ser detectado por propriedades do soluto tanto existentes, como desenvolvidas por reações químicas. Estas propriedades podem ser caracterizadas pela absorbância, condutividade, índice de refração, fluorescência, etc. As medidas podem ser feitas manualmente em cada amostra ou por métodos automáticos, onde o eluente da coluna é mecanicamente encaminhado aos detectores que determinam a substância de acordo com seu princípio e registram o resultado já em curvas, ou simplesmente em números que podem ser manipulados. Em separações onde o material é usado posteriormente as frações são coletadas por coletores automáticos que podem ser calibrados em termos de volume ou tempo, principalmente.

5. PARÂMETROS EXPERIMENTAIS EM CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

O principal e o primeiro objetivo de uma separação é a obtenção de uma boa resolução dos componentes da mistura. Uma vez obtidos valores de resolução maiores que 1, esta é adequada; deve-se

considerar também condições para recuperação máxima com a menor diluição. Para atingir estes objetivos várias decisões devem ser tomadas, baseadas em experiências anteriores e/ou parâmetros teóricos. Estes serão discutidos nos itens seguintes.

5.1. Tipo de gel

Se o problema for de separação de grupos de substâncias, como por exemplo, dessalificação, o gel escolhido deve ter um Kav = 0 para as substâncias de alta massa molecular; massas moleculares menores devem ser eluídas perto de V_t, Kav = 1. Sephadex G-25 pode ser útil para dessalificar ou remover compostos de baixa massa molecular, de soluções de proteínas. De outro lado, para dessalificar soluções de peptídeos ou outras substâncias de massa molecular entre 1000 e 5000, deve-se usar Sephadex G-10 ou G-25, ou Bio-Gel P-2 ou P-4. Para fracionar substâncias de massa molecular semelhante, deve-se estudar as curvas de seletividade dos diferentes géis *(Figura VI-2)*. A(s) molécula(s) de interesse deve(m) ter massa molecular situada na parte linear da curva de seletividade e intermediária(s) a uma série de padrões. Nas determinações de massas moleculares ou em trabalhos com proteínas pouco solúveis (membranas) é comum o uso de meios de dissociação ou detergentes. Nestas condições, devido ao efeito destes agentes na conformação das proteínas, é preciso um gel de poros mais abertos do que aquele indicado pela curva de seletividade. Detergentes não afetam o tamanho do poro. A seleção do tamanho de partícula dos diferentes materiais usados será determinada pelo tipo de separação. Partículas menores dão boas colunas e boa resolução. Entretanto, devido a problemas de vazão em rotina de laboratório, prefere-se partículas de tamanho intermediário, reservando as maiores para trabalho preparativo.

As Tabelas *VI-1 a VI-4* indicam as faixas de massas moleculares e outras informações para vários tipos de fases estacionárias.

Tabela VI-1

Comparação das propriedades dos recheios: Sephadex[a] e Bio-Gel[b]

Sephadex	Diâmetro das partículas secas (μm)	Limite de exclusão (massa molecular)	Bio-Gel	Diâmetro das partículas úmidas (μm)	Limite de exclusão (massa molecular)
G10	40-120	700	---	---	---
G15	40-120	1.500	p-2	40-80	1.800
---	---	---	p-4	40-80	4.000
G25	50-150	5.000	p-6	40-80	6.000
---	---	---	p-10	40-80	20.000
G50	50-150	30.000	p-30	80-150	40.000
---	---	---	p-60	80-150	60.000
G75	40-120	80.000	p-100	80-150	100.000
G100	40-120	150.000	---	---	---
---	---	---	p-250	80-150	200.000
G150	40-120	300.000	---	---	---
---	---	---	p-300	150-300	400.000
G200	40-120	600.000	---	---	---

[a] Pharmacia, Suécia
[b] Bio-Rad, EUA

Tabela VI-2

Propriedades do recheio Sephacryl*

Tipo	Diâmetro das partículas úmidas (μm)	Intervalo de fracionamento (massa molecular)	
		proteínas	polissacarídeos
S-200 Superfina	40-105	$50x10^3$-$2,5x10^5$	$1x10^3$ - $8x10^4$
S-300 Superfina	40-105	$1x10^4$-$1,5x10^6$	$1x10^3$-$7,5x10^5$

* Pharmacia, Suécia

Tabela VI-3

Propriedades do recheio Sepharose[a]

Tipo	Conc. da Agarose (aproximada) %	Diâmetro das partículas úmidas (μm)	Intervalo de fracionamento (massa molecular)	
			proteínas	polissacarídeos
2B	2	60-200	$70x10^4$- $40x10^6$	$1x10^5$-$20x10^6$
4B	4	60-140	$60x10^4$-$20x10^6$	$3x10^4$-$5x10^6$
6B	6	45-165	$1x10^4$- $4x10^6$	$1x10^4$-$1x10^6$

[a] Pharmacia, Suécia

Tabela VI-4

Propriedades do recheio Shodex*

Fase móvel	Tipo	Intervalo de fracionamento (massa molecular)
Orgânica	A801/S	50 - 1.000
	A802/S	50 - 5.000
	A803/S	400 - 70.000
	A804/S	1.000 - 500.000
	A805/S	10.000 - 5.000.000
	A806/S	100.000 - 50.000.000
Aquosa	S801/S	50 -1.000
	S802/S	50 - 5.000
	S803/S	300 - 50.000
	S804/S	1.000 - 500.000
	S805/S	10.000 - 5.000.000

* Showa Denka, Japão

5.2. Tamanho da coluna

A resolução aumenta com a raiz quadrada do comprimento da coluna. Em lugar de uma única coluna longa este efeito pode ser mimetizado pelo uso de reciclagem ou colunas em série.

5.3. Tamanho da amostra

Para uma boa resolução, a zona em que está a amostra deve ser pequena em relação ao comprimento da coluna. A amostra deve ser 1 a 5% do volume da coluna. Em separações de grupos esse volume pode ser aumentado, às vezes até 30%, sem diluição excessiva da amostra. Nestes casos também é importante usar colunas de maior diâmetro e menor altura, o que fornece uma vazão maior e separação mais rápida.

Baixa viscosidade da amostra é importante para uma boa resolução. Alta viscosidade causa instabilidade de zona e vazão irregular. Na prática, a relação entre a viscosidade da amostra e do eluente não deve ser maior do que 2, o que corresponde a uma concentração de proteína de 70 mg/mL quando o eluente é um tampão diluído.

5.4. Vazão da fase móvel

A resolução decresce com a vazão. Para proteínas a vazão de 2 mL cm^{-2} h^{-1} é ótima para colunas de laboratório. Entretanto até 10 mL cm^{-2} h^{-1} não há deterioração da resolução. A *Tabela VI-5* indica algumas pressões e vazões para várias fases estacionárias.

Tabela VI-5

Pressões e vazões máximas para vários géis*

Tipo		Pressão máxima de operação (kPa)	vazão (mL/min)	fluxo ($mLcm^2h^{-1}$)
Sephadex	G-10 a G-50	**		
	G-75	16	6,4	77,0
	G-75 SF	16	1,5	18,0
	G-100	10	4,2	50,0
	G-100 SF	10	1,0	12,0
	G-150	4	1,9	23,0
	G-150 SF	4	0,5	6,0
	G-200	2	1,0	12,0
	G-200 SF	2	0,25	3,0
Sepharose	6B	9	1,16	14,0
	4B	6	0,96	11,5
	2B	3	0,83	10,0
	CL-6B	>12	2,5	30,0
	CL-4B	12	2,17	26,0
	CL-2B	5	1,25	15,0
Sephacryl	S-200	30	2,5	30,0
	S-300	30	2,5	25,0

* Dados obtidos com colunas de 30 x 2,5 cm.

** Obedece à lei de Darcy.

5.5. Tratamento da coluna

A homogeneidade da coluna pode ser verificada com uma solução colorida, geralmente Blue Dextran 2000 (Pharmacia) em uma concentração de 2 mg/mL. O movimento da zona de cor azul é observado e deve ser compacto e uniforme . Exame da coluna em luz transmitida também permite ver falhas, bolhas de ar, etc. Após o término da separação o gel e os tampões devem ser mantidos em meio que impede o crescimento de microorganismos. O mais usado é solução aquosa de azida de sódio, NaN_3 , 0,02%.

6. APLICAÇÕES DE CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

Em experiências de separação de substâncias ou purificação, pode-se distinguir nitidamente dois tipos de situações. Em separações de grupos, as moléculas diferem no seu tamanho, que é possível selecionar um gel onde as moléculas grandes têm um Kav = 0 e as pequenas com um valor se aproximando de 1. Dessalificação preparatória para liofilisação ou concentração é um exemplo marcante deste tipo de separação; é eficiente e rápido comparado com outros métodos, tais como diálise. Outros usos são: troca de tampões para prosseguimento de métodos de purificação, remoção de fenol de preparações de ácidos nucléicos; remoção de substâncias radioativas de pequena massa molecular, em processos de marcação destes; remoção de produtos, inibidores ou co-fatores da mistura contendo enzimas.

O segundo tipo de separação envolve separação de moléculas com massas moleculares mais próximas e, portanto, com valores de Kav mostrando diferenças menores. Aqui a escolha correta do gel é crítica. Se o limite de exclusão do gel está muito acima da maior massa molecular, a resolução diminui, os solutos se diluem e a vazão diminui. Em caso contrário, parte das substâncias a serem separadas serão obtidas sem interações na parte intrasticial da coluna.

A cromatografia por exclusão permite também a determinação da massa molecular ou tamanho de proteínas nativas ou desnaturadas em condições variadas de pH, temperatura e força iônica. Uréia e cloreto de guanidina são agentes que transformam polipeptídeos e proteínas em uma configuração de hélice ao acaso, eliminando as diferenças estruturais. Para este procedimento é necessário uma coluna contendo Sephacryl, Sephadex ou Sepharose, calibrada com uma série de padrões protéicos, que podem ser adquiridos em conjunto para cada intervalo de massa molecular desejado ou preparado no laboratório a partir de proteínas isoladas. As colunas calibradas podem ser usadas durante muito tempo em separações de rotina.

Outros usos compreendem a determinação da massa molecular de polímeros naturais ou sintéticos, possibilidade esta que atualmente é primordial para o controle de qualidade destes compostos. O conhecimento da distribuição de massas moleculares de um polímero é a melhor maneira de predizer se suas propriedades físicas como força, flexibilidade, rigidez, fragilidade e adesividade serão ou não corretas. O cloreto de polivinila deve ter sua qualidade determinada pelo estudo da distribuição das massas moleculares de seus polímeros.

Determinação de constantes de equilíbrio e separação de células e partículas também podem ser efetuadas por cromatografia por exclusão.

7. REFERÊNCIAS

- FISCHER, L. *An Introduction to Gel Chromatography*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 1969.
- *Gel Filtration, Theory and practice*, Publicação da Pharmacia Fine Chemicals, 1979.
- *Laboratory Outline (Biochemistry 371)*, Department of Biochemistry, University of Toronto, Toronto, 1979.
- YOST, R.W.; ETTRE, L.S. e CONLON, R.D. *Introdución a la Cromatografia Liquida Pratica*, Perkin Elmer, 1980.

CAPÍTULO VII

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Augusto César C. Spadaro
e
Maria José Vieira Fonseca

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

A cromatografia por bioafinidade distingue-se dos outros métodos cromatográficos por basear-se, principalmente, nas propriedades biológicas ou funcionais das espécies que interagem: a substância a ser separada e a fase estacionária.

Os primeiros trabalhos descrevendo esta modalidade de cromatografia datam de 1959, quando CAMPBELL, LEUSCHER e LEMAN, empregando anticorpo anti-haptenos, fizeram importantes observações, possibilitando que LERMAN utilizasse, pela primeira vez, a cromatografia de bioafinidade, na purificação da tirosinase. No entanto, foi no início da década de 60 que esse tipo de cromatografia teve um grande impulso, através dos trabalhos de CUATRECASSAS, WILCHECK, ANFINSEN e PORATH, passando a ser amplamente empregada como método de purificação de macromoléculas. Para se ter uma idéia, entre 1980-82, foram catalogadas 1800 publicações que empregavam a cromatografia por bioafinidade como uma etapa de purificação de moléculas biologicamente ativas.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O princípio da cromatografia por bioafinidade é o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos.

Basicamente, a metodologia da cromatografia por bioafinidade envolve a preparação de uma fase estacionária seletiva, por imobilização covalente de ligantes específicos à matriz ou suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna contendo o ligante específico da amostra ligado ao suporte sólido. As moléculas que não possuem apreciável afinidade pelo ligante passam pela coluna sem serem ligadas, enquanto que as macromoléculas capazes de unirem-se a este são retidas.

A eluição das moléculas ligadas pode ser feita por alteração do pH e/ou força iônica do meio, que tornam o complexo molécula- ligante menos estável, levando à dissociação do mesmo, ou ainda pelo emprego de substâncias com maior afinidade pelo ligante do que a molécula que se deseja purificar.

O esquema apresentado na *Figura VII-1* ilustra o princípio deste método cromatográfico. As formas geométricas(Δ, ●, ο,□)representam os vários tipos de substâncias presentes na amostra (passo 1). Destas,

apenas a substância representada pelo triângulo possui afinidade química pelo ligante, o qual se encontra imobilizado covalentemente à matriz (passo 2).

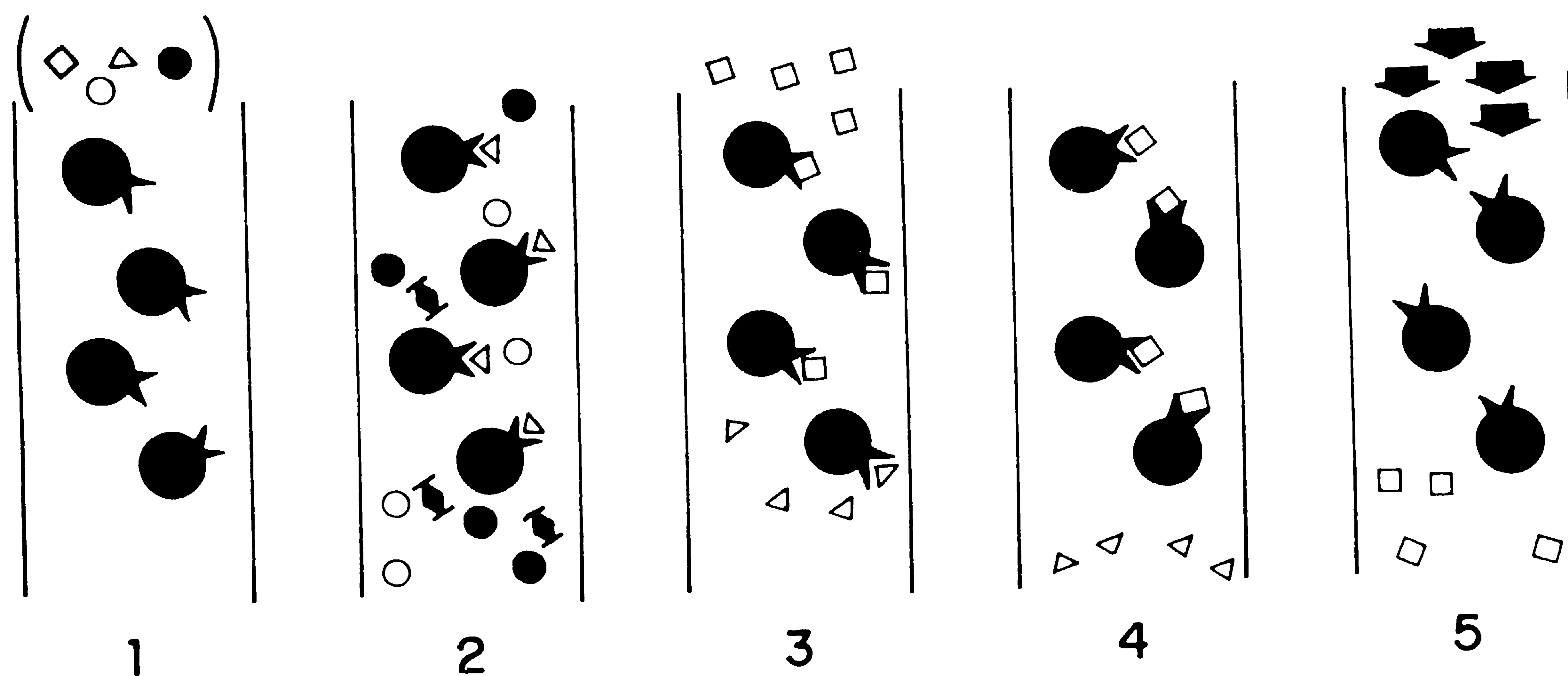



FIGURA VII-1 Esquema do princípio da cromatografia por bioafinidade.

A coluna é equilibrada e eluída em um determinado tampão inicial, sendo que nesta condição são praticamente eliminadas todas as substâncias que não foram ligadas por bioafinidade ao conjunto ligante-matriz, além daquelas que apresentam afinidade (triângulo), mas que excedem à capacidade de retenção da coluna.

A eluição da substância do ligante é realizada por modificações de pH, força iônica, ou ainda pela adição de uma substância que tenha maior afinidade pelo ligante (passos 3 e 4).

A regeneração da coluna (passo 5) é efetuada através da passagem de eluentes, que a deixam na condição inicial (tampão de equilíbrio inicial).

A cromatografia por bioafinidade pode ser aplicada a uma grande variedade de sistemas macromoléculas-ligante como, por exemplo, para a purificação de enzimas, antibióticos, antígenos, ácidos nucléicos, proteínas transportadoras, proteínas repressoras, drogas ou receptores hormonais, proteínas contendo grupos sulfídricos, complexos poliribossômicos específicos e multienzimáticos, e outros sistemas biológicos *(Tabela VII-1)*.

O sucesso do emprego deste tipo de cromatografia depende da seleção adequada do suporte insolúvel ou matriz, do ligante específico, das condições de ligação entre ambos e das condições de retenção e eluição das moléculas em questão.

Tabela VII-1

Relação biológica entre substâncias com possibilidade de separação por cromatografia por bioafinidade

Substância	Possibilidade de ligação
Enzimas	Substratos, cofatores, inibidores competitivos
Ácidos nucléicos	Seqüência de bases complementares, histonas, enzimas específicas
Hormônios e Vitaminas	Proteínas transportadoras, receptores
Anticorpos	Antígenos, células
Lectinas	Glicoproteínas, polissacarídeos
Células	Lectinas, proteínas específicas da superfície da célula

3. SELEÇÃO DO SUPORTE INSOLÚVEL OU MATRIZ

As matrizes de ancoragem do ligante são de fundamental importância e devem possuir as seguintes propriedades: serem mecânica e quimicamente estáveis sob as condições de acoplamento, as variações de pH, força iônica, temperatura e a presença de agentes desnaturantes, como uréia, cloreto de guanidina e detergentes; serem de preferência uniformes, esféricas, rígidas e porosas, para exibirem boas propriedades de vazão mesmo após o acoplamento; devem interagir fracamente com macromoléculas, em geral, para diminuir a adsorção não específica das mesmas, e devem possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados para permitirem a ligação química de uma variedade de ligantes.

Muitas substâncias possuem essas propriedades que permitem empregá-las como suporte insolúvel ou matrizes na cromatografia por bioafinidade; entre elas destacam-se a agarose, a celulose, o dextrano, a poliacrilamida e outros polímeros, partículas porosas de alumina, vidro de porosidade controlada e algumas associações entre as substâncias citadas.

3.1. Agarose

A agarose é um gel de rigidez considerável e inércia biológica relativa, sendo grandemente empregado como matriz na cromatografia por bioafinidade. A sua constituição e principais propriedades foram mencionadas no capítulo VI, seção 3.4.3, e a sua estrutura é ilustrada na *Figura VI-5*.

A retenção inespecífica de proteínas na agarose está relacionada à presença de grupos iônicos como éster sulfatos, metoxil e grupos carboxílicos. A eliminação ou diminuição dos efeitos indesejáveis desses grupos procede por tratamento do gel com borihidreto, em solução alcalina, por duas horas.

Outro aspecto importante a ser considerado relaciona-se à estrutura secundária da agarose, a qual consiste de uma cadeia linear de polissacarídeos, sem ligações covalentes cruzadas, que implica em instabilidade térmica; dificuldade de congelamento ou secagem, pronta solubilidade na presença de agentes desnaturantes e mudanças drásticas e irreversíveis da estrutura do gel na presença de alguns solventes orgânicos, como álcool e acetona. Portanto, o uso da agarose como suporte insolúvel ou matriz, na cromatografia por bioafinidade, está relacionado ao aumento da estabilidade da estrutura secundária do gel, através da reação com a epicloroxidrina, em meio alcalino. Tal reação leva à formação de ligações covalentes cruzadas entre cadeias de agarose, tornando a matriz mecanicamente rígida e mais estável a reagentes orgânicos ou inorgânicos.

3.2. Matriz de celulose

A celulose é um biopolímero linear de glicose com ligações β-1,4 e ocasionalmente β-1,6, como mencionado no capítulo V, seção 3.3.1. Algumas das limitações no uso de celulose em cromatografia por

troca iônica e por bioafinidade são devidas à sua estrutura física instável (perda de porosidade) e forma geométrica irregular. No entanto, por tratamento químico conveniente estas limitações são contornadas por obtenção de esferas mais regulares e porosas, sem contudo comprometer a sua rigidez mecânica.

3.3. Matriz de dextrano

O dextrano, um polímero de unidades de glicose unidas predominantemente por ligações α -1-6, produzido por bactérias (**Leuconostoc Mesenteróides, Leoconostoc Dextranicium**) a partir do dissacarídeo sacarose, é empregado como matriz em cromatografia por bioafinidade, após tratamento com epicloroxidrina para a formação de ligações cruzadas covalentes entre as cadeias polissacarídicas (ver *Figura VI-4*).

A matriz dextrano apresenta como característica principal um elevado número de grupos hidroxilas disponíveis, que a tornam mais hidrofílica que a agarose, mas possui como limitação a formação de ligações cruzadas indesejáveis durante a sua ativação , tornando o gel menos poroso, dificultando a vazão da fase móvel na coluna.

3.4. Matriz de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida são formados por uma estrutura de hidrocarbonetos, na qual estão ligados grupos amida como indicado no capítulo VI, seção 3.4.2. Esses géis apresentam as características principais de estabilidade em pH 1 a 10, de não conterem grupos ionizáveis, portanto com as interações não específicas mínimas, de serem biologicamente inertes e de não serem atacados por microorganismos.

A perda da estabilidade mecânica constitui uma desvantagem deste gel, a qual limita seu uso como suporte para cromatografia por bioafinidade. Por essa razão, os géis de poliacrilamida são modificados a derivados de aminoetil, por reação com etilenodiamino a 90°C e a derivados hidrazínicos usando-se hidrazina a 50°C

3.5. Matriz de trisacril

Trisacril são géis sintéticos derivados da polimerização do monômero N-acrilosil-2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, que são suportes para cromatografia por exclusão, troca iônica e bioafinidade. A *Figura VII-2* mostra as estruturas químicas do monômero e do polímero deste gel.

A presença de três grupos hidroximetil e um alquilamida, por unidade, confere a essas macromoléculas um caráter hidrofílico útil para a separação de macromoléculas biológicas, especialmente proteínas e células. Os géis trisacril apresentam outras características como não serem biodegradáveis sob ampla faixa de temperatura (-20°C a 121°C), resistirem à ação de agentes desnaturantes e à acidez, suportarem moderadas pressões sem sofrerem alterações da forma, sendo por isso grandemente aplicados em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência.

a

$$CH_2=CH-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-C(CH_2OH)_3$$

b

$$-CH_2-CH(CONHC(CH_2OH)_3)-CH_2-CH(CONH_2)-CH_2-CH(CONHC(CH_2OH)_3)-CH_2-CH(CONH_2)-CH_2-CH(CONHC(CH_2OH)_3)-$$

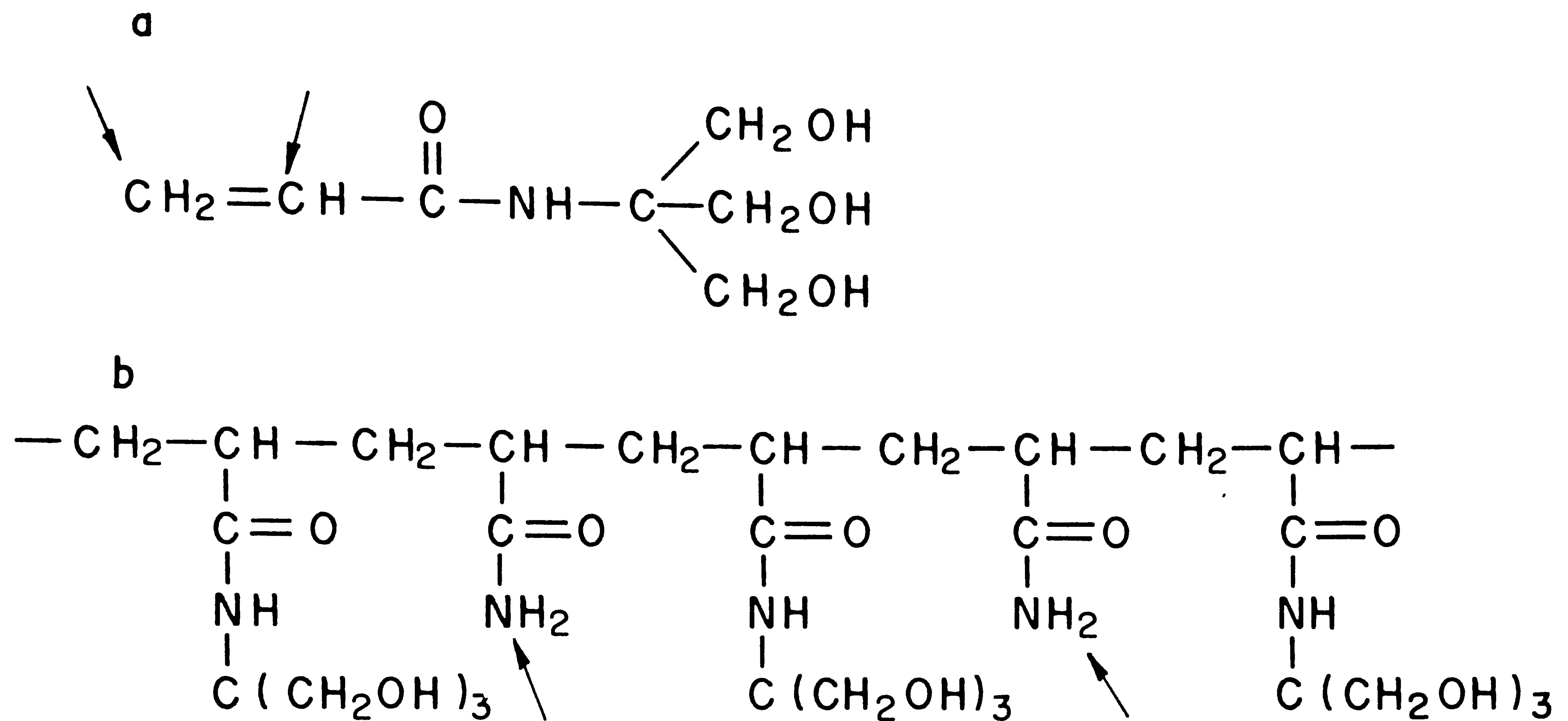



FIGURA VII-2 Estruturas químicas do monômero (a) e polímero de trisacril (b). As setas indicam os pontos de reação para formação do polímero (a) e o local de união do ligante (b).

3.6. Outras matrizes orgânicas

3.6.1. Géis hidroxialquil metacrilato

WICHTERLE e LINS introduziram os géis hidroxialquil metacrilatos hidrofílicos que são sintetizados por polimeração de hidroxialquilesteres do ácido metacrílico e alquilenodimetacrilato. A estrutura do polímero está representada na *Figura VII-3.* Os géis são regulares com estabilidades química e física excelentes, resistem a altas pressões e aquecimento a 150°C, podem ser empregados com solventes orgânicos e são biologicamente inertes.

3.6.2. Géis de poliacrilamida-agarose

Géis de poliacrilamida-agarose produzidos por combinação de poliacrilamida e agarose são rígidos, suportam até grande vazões e apresentam a capacidade de unirem ligantes tanto nos grupos hidroxílicos da agarose quanto nos grupos aminas da poliacrilamida.

```
CH3          CH3          CH3          CH3
|            |            |            |
C — CH2 — C — CH2 — C — CH2 — C —
|            |            |            |
C = O        R            R            C = O
|                                      |                    |
O                                      O                    C = O
|                                      |                    |
(CH2)2                                 (CH2)2          R =  O
|                                      |                    |
O                                      O                    (CH2)2
|                                      |                    |
C = O        CH3          CH3          C = O                OH
|            |            |            |
C — CH2 — C — CH2 — C — CH2 — C —
|            |            |            |
CH3          R            R            CH3
```

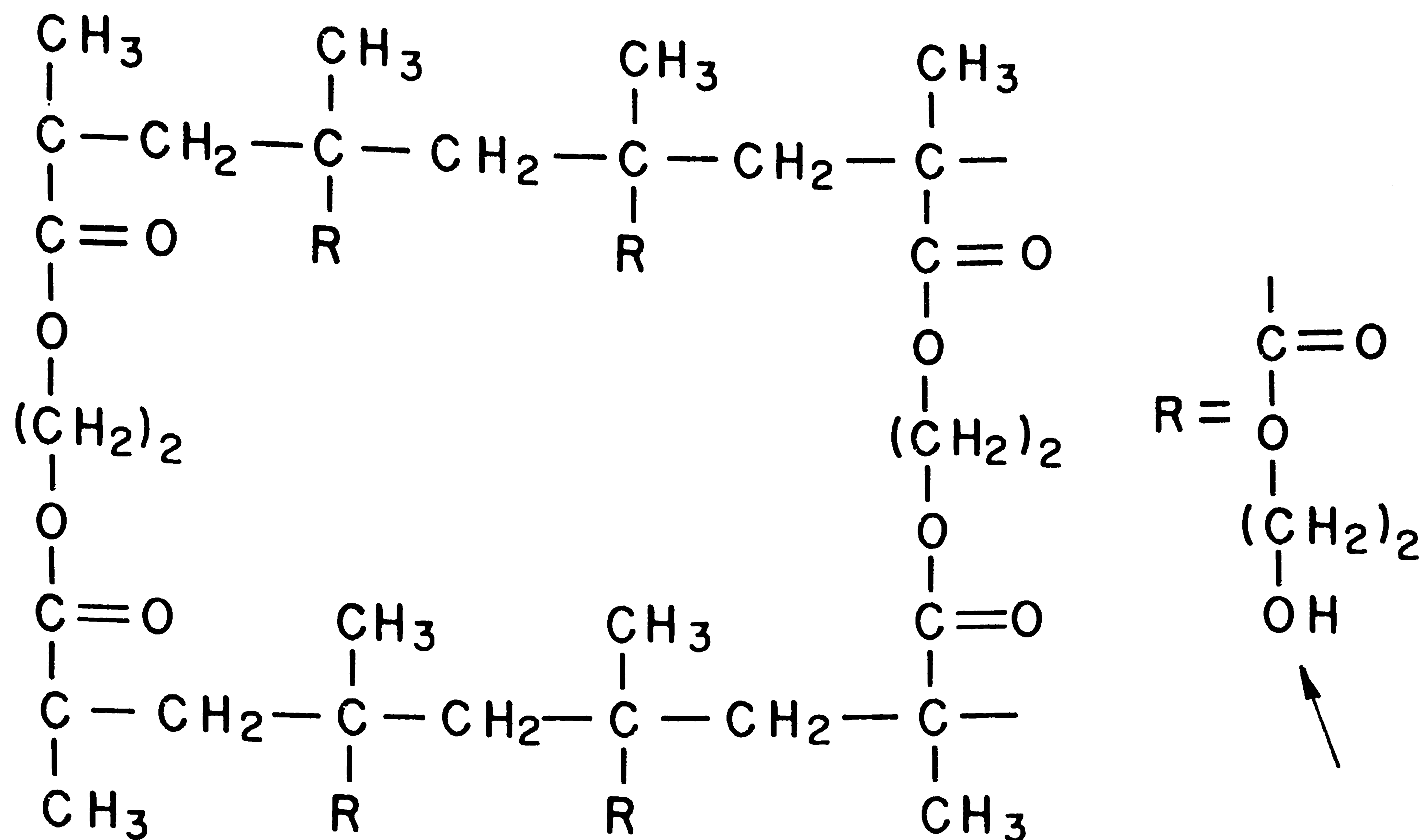



FIGURA VII-3 Estrutura do polímero de hidroxialquilmetacrilato. A seta indica os grupos hidroxilas que apresentam propriedades análogas às da agarose.

Outros suportes orgânicos para uso em cromatografia por bioafinidade são os copolímeros de vinilacetatoetileno, poliestireno, alginato de sódio e náilon.

3.7. Matrizes inorgânicas

A maioria das matrizes de polissacarídeos são inadequadas para sistemas de alta pressão devido à baixa estabilidade mecânica. Por esse motivo foram desenvolvidas matrizes de materiais inorgânicos de estruturas químicas e físicas compatíveis com sistemas que requerem maiores pressões.

As partículas porosas de alumina foram empregadas em meados da década de 70, como suporte insolúvel para imobilização de enzimas em substituição ao suporte polissacarídeo mas apresentaram, como desvantagem, uma baixa vazão.

Outra possibilidade para imobilização de moléculas biológicas é o uso de partículas de vidro com porosidade controlada. Essas partículas são sintetizadas por aquecimento de certos borosilicatos a 500-800°C por tempo prolongado e têm uma variação de poros entre 2,5 e 7,0 nm.

A matriz de vidro é mecânica, termicamente estável e quimicamente compatível com muitos solventes orgânicos. A desvantagem desse suporte consiste na ligação não-específica de aminas protéicas e íons amônio

pelos grupos silanol ou em sítios de boro, que agem como ácido de Lewis, existentes na superfície do vidro. Para prevenir essa ligação iônica, a superfície do vidro deve ser revestida por uma camada orgânica de modo a cobrir os grupos silanol.

4. PREPARAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS SELETIVAS

A preparação de fases estacionárias seletivas envolve duas etapas: a ativação da matriz e o subseqüente acoplamento do ligante.

A fase de ativação compreende a ligação de grupos reativos à matriz inerte, podendo ser esquematizada da seguinte forma: os grupos hidroxílicos ou aminas livres da matriz são ativados por reação com reagentes bifuncionais do tipo A-R-B, onde o lado do grupo A liga-se à matriz e o do grupo B ao ligante. A fase de acoplamento envolve a ligação covalente do ligante à matriz ativada *(Figura VII-4)*.

a

M—OH + A—R—B ⟶ M—O—R—B + HA

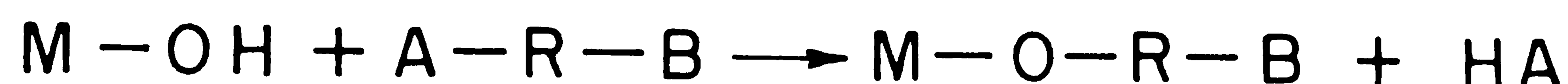
b

M—O—R—B + H—LIGANTE ⟶ M—OR—LIG. + HB

FIGURA VII-4 Esquema que ilustra as fases de ativação da matriz (a) e de acoplamento do ligante (b).

O sucesso da purificação de macromoléculas por cromatografia por bioafinidade muitas vezes está relacionado com a distância existente entre a superfície do suporte e o ligante específico, no qual as macromoléculas ligar-se-ão. Fatores estéricos devem ser considerados, quando proteínas de massa molecular elevada são separadas por esse processo e ligantes específicos pequenos são acoplados diretamente à matriz. Neste caso, o problema pode ser solucionado através da preparação de ligantes específicos com uma cadeia de hidrocarboneto, a qual recebe o nome de braço; alternativamente, a extensão de hidrocarboneto pode ser primeiramente ligada ao suporte sólido, e a seguir, liga-se covalentemente o ligante específico a esse braço. A *Figura VII-5* mostra o efeito do aumento do espaço entre o ligante e o suporte sólido.

MACROMOLÉCULAS

LIGANTES

a b

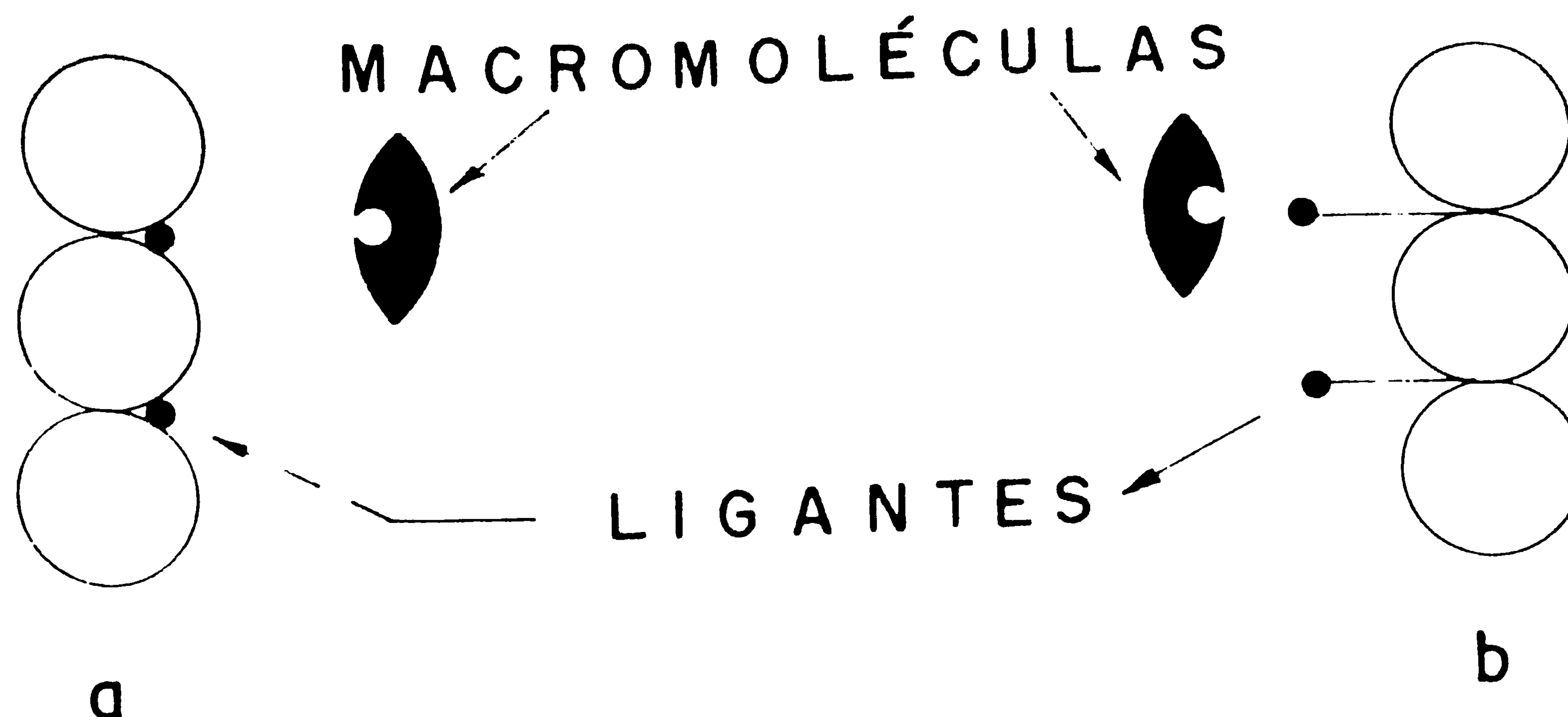



FIGURA VII-5 A aplicação do princípio de "braços" para facilitar a união entre ligante e a substância a ser isolada. a: ligante unido diretamente à matriz; b: ligante unido à matriz por um braço.

4.1. Métodos de ativação de matrizes hidroxílicas

4.1.1. Ativação pelo brometo de cianogênio e derivados

O brometo de cianogênio (CNBr) é o reagente mais utilizado para a ativação de matrizes de polissacarídeos, tais como dextrano e agarose.

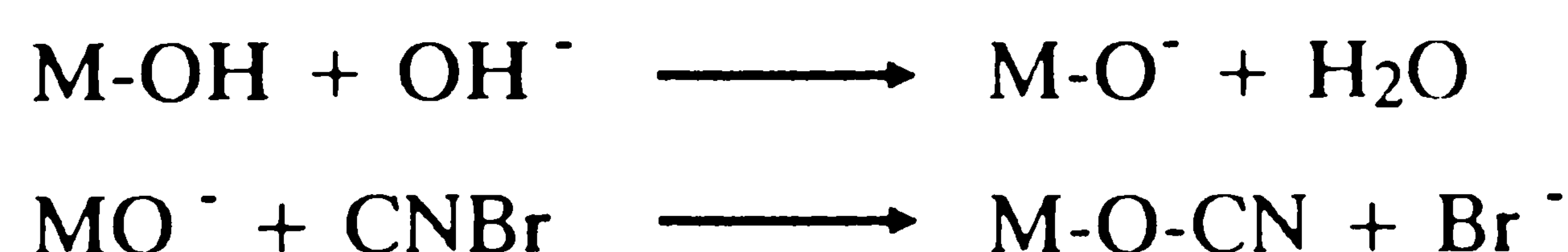
A natureza química exata dos intermediários formados durante a reação da agarose com CNBr é desconhecida, mas os principais produtos formados, que se acoplam com grupos aminos, parece ser uma mistura de derivados de iminocarbonato (~20%) e isouréia (obtida em rendimento de ~80%). Na *Figura VII-6* pode-se observar o mecanismo de ativação de uma matriz polissacarídica pelo CNBr.

A agarose ativada por CNBr reage covalentemente, em pH 10,0, com grupos aminos primários em sua forma não-protonada, tais como o grupo α -amino da lisina ou compostos aminoalquil. Valores de pH acima de 10,0 resultam em menor eficiência de acoplamento devido a grande redução da agarose ativada.

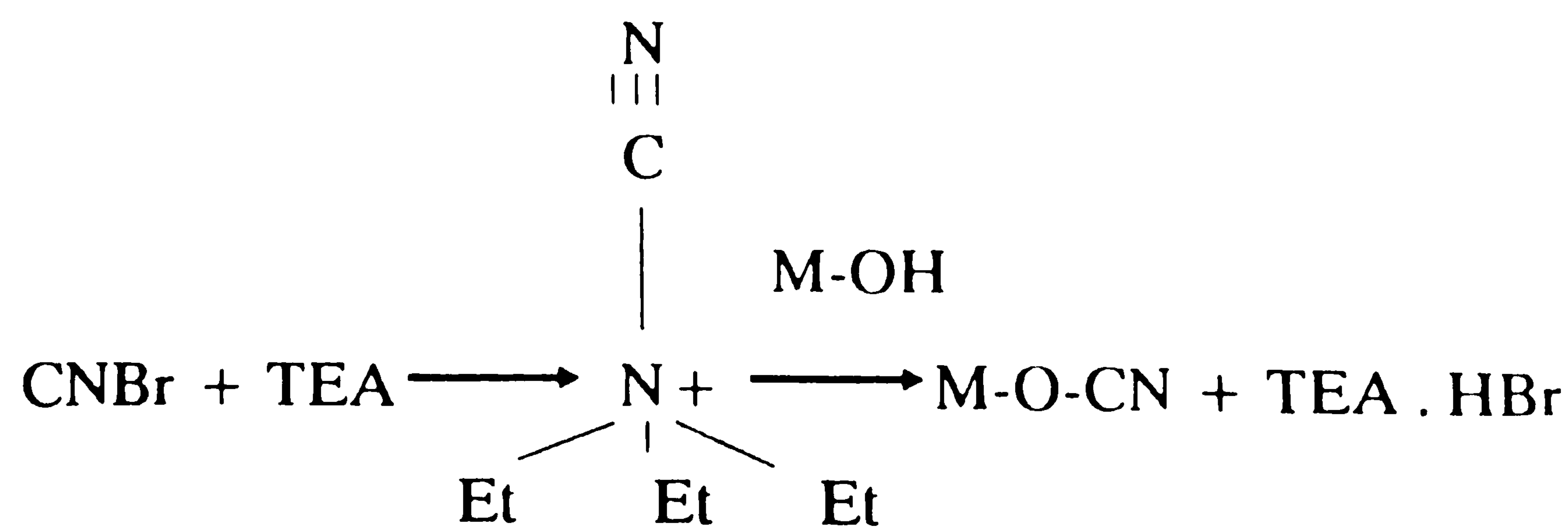
Os primeiros trabalhos relativos à ativação de matrizes com brometo de cianogênio (década 60) empregaram bases inorgânicas, como o hidróxido de sódio. Recentemente foi proposto o uso de bases orgânicas, como a trietilamina, onde se obtém derivados quase que exclusivamente de isouréia, resultando em um maior rendimento do processo.

A ativação em presença de hidróxido de sódio forma um centro nucleofílico no esqueleto do suporte, o qual reage com brometo de cianogênio. Assim:

$$\text{M-OH} + \text{OH}^- \longrightarrow \text{M-O}^- + H_2O$$

$$\text{MO}^- + \text{CNBr} \longrightarrow \text{M-O-CN} + \text{Br}^-$$

onde M representa a matriz.

No caso da base orgânica, um composto eletrofílico intermediário é formado pela reação de CNBr com a base trietilamina, o que reage posteriormente com o grupo hidroxila da matriz. Deste modo:

$$\text{CNBr} + \text{TEA} \longrightarrow \underset{\text{Et}\ \ \text{Et}\ \ \text{Et}}{\overset{\text{N}\equiv\text{C}}{\text{N}^+}} \xrightarrow{\text{M-OH}} \text{M-O-CN} + \text{TEA . HBr}$$

composto intermediário eletrofílico

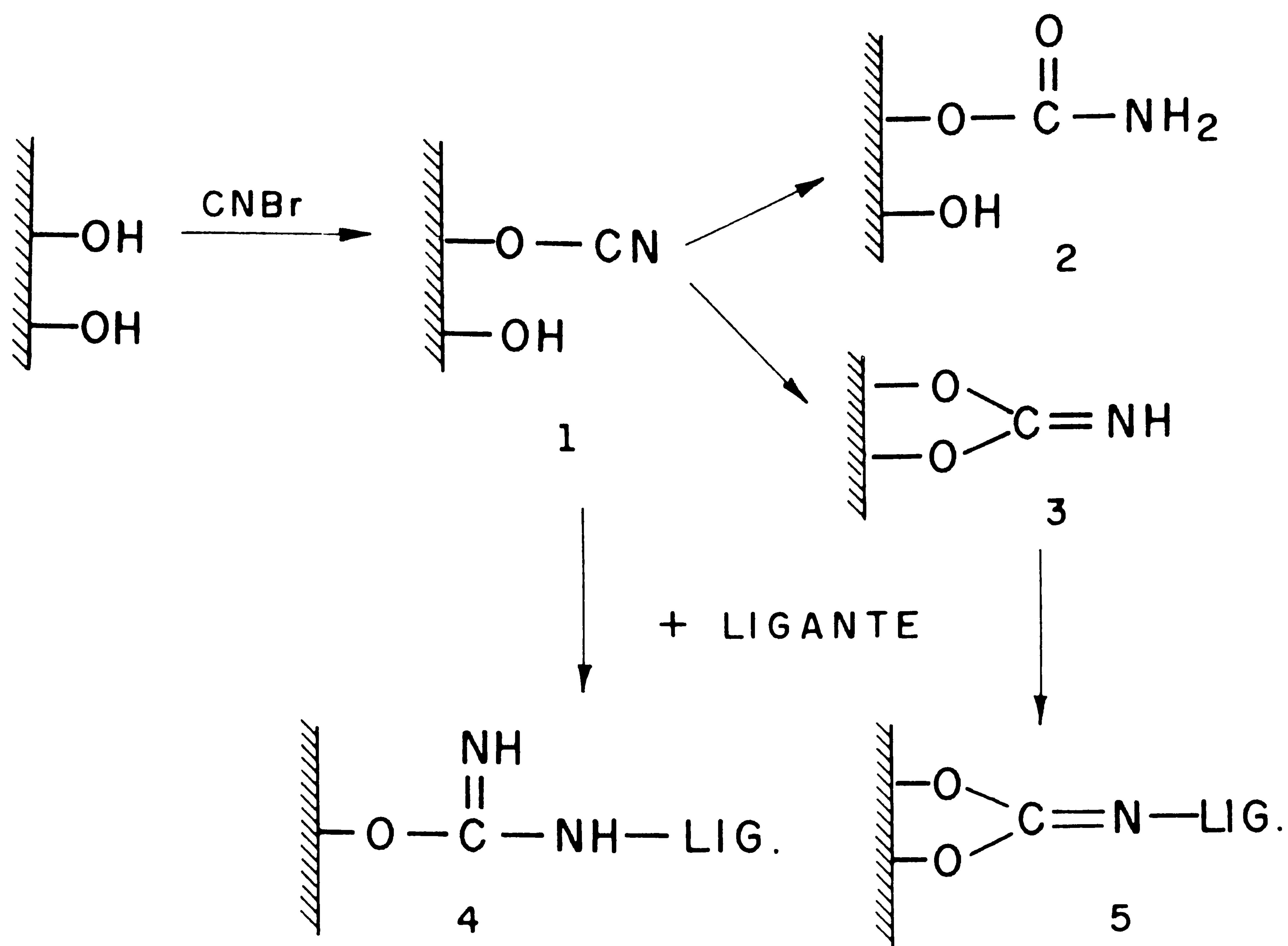



FIGURA VII-6 Mecanismo de ativação típico de uma matriz polissacarídica pelo brometo de cianogênio.
1: éster cianato (muito reativo)
2: derivado carbamato (inerte)
3: imidocarbonato cíclico (pouco reativo)
4: derivado isouréia
5: derivado imidocarbonato

O conhecimento do mecanismo de ativação da matriz pelo CNBr possibilitou o uso de reagentes alternativos derivados do cianeto como p-nitrofenilcianato e N-cianotrietilamônio, que são mais eficazes e menos perigosos à vida humana, podendo ser manipulados e armazenados com mais segurança.

4.1.2. Ativação por Bis-oxirano

Os reagentes bis-oxiranos, tais como o éter 1,4-butanodiol diglicidoxi, reagem prontamente em meio alcalino com géis contendo grupos hidroxílicos ou amino livres. Desta forma, os géis derivados apresentam uma cadeia hidrofílica longa, que serve como molécula espaçadora entre o ligante específico e a superfície da matriz e um grupo reativo, oxirano (epóxido), que reage com ligantes nucleofílicos (aminas e fenóis) para formar adsorventes biosseletivos.

4.1.3. Ativação por oxidação com periodato

Outro método de ativação de matrizes hidroxílicas envolve a oxidação dos grupos dióis vicinais das matrizes a aldeído empregando o metaperiodato de sódio ($NaIO_4$), como agente oxidante.

Os grupos aldeídos formados reagem com aminas primárias em pH 4 a 6, formando uma base de Schiff, a qual é estabilizada por redução com boroidreto de sódio ($NaBH_4$) ou, preferencialmente, cianoboridreto de sódio ($NaBH_3CN$).

4.1.4. Ativação por cloretos de sulfonila orgânicos

Os haletos de sulfonila orgânicos reagem com os grupos hidroxílicos de matrizes polissacarídicas, formando um derivado ester sulfonado do gel. O grupo sulfonado desses ésteres é facilmente deslocado por agentes nucleofílicos (aminas por reações de substituição do tipo S_N2), permitindo o acoplamento de moléculas de interesse biológico.

4.1.5. Ativação por divinilsulfona

O reagente bifuncional divinilsulfona ($CH_2=CH\text{-}SO_2\text{-}CH=CH_2$) é empregado como agente ativador de matrizes hidroxílicas. A reação entre o divinilsulfona e o grupo hidroxila da matriz leva à formação do derivado éter etilvinilsulfonil do polímero hidroxílico. Os grupos vinil introduzidos na matriz são bastante reativos e se acoplam a aminas, álcoois e fenóis, em meio ácido e à baixa temperatura.

Na *Figura VII-7* são mostrados alguns exemplos de substâncias utilizadas na ativação de matrizes hidroxílicas.

a $$M-OH + R-SO_2Cl \longrightarrow M-OSO_2-R$$

b $$M-OH + (C_3H_3N_2)-N-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-N(C_3H_3N_2) \longrightarrow M-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-N(C_3H_3N_2)$$

c $$M-OH + Cl-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-C_6H_4-NO_2 \longrightarrow M-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-C_6H_4-NO_2$$

d $$M-OH + CH_2=CH-SO_2-CH=CH_2 \longrightarrow M-O-CH_2CH_2SO_2CH=CH_2$$

e $$M(OH)(OH) + NaIO_4 \longrightarrow M-C\overset{O}{\underset{H}{<}} \xrightarrow{R-NH_2} M-\overset{H}{\overset{|}{C}}=N-R \xrightarrow{NaBH_4} M-CH_2-NH-R$$

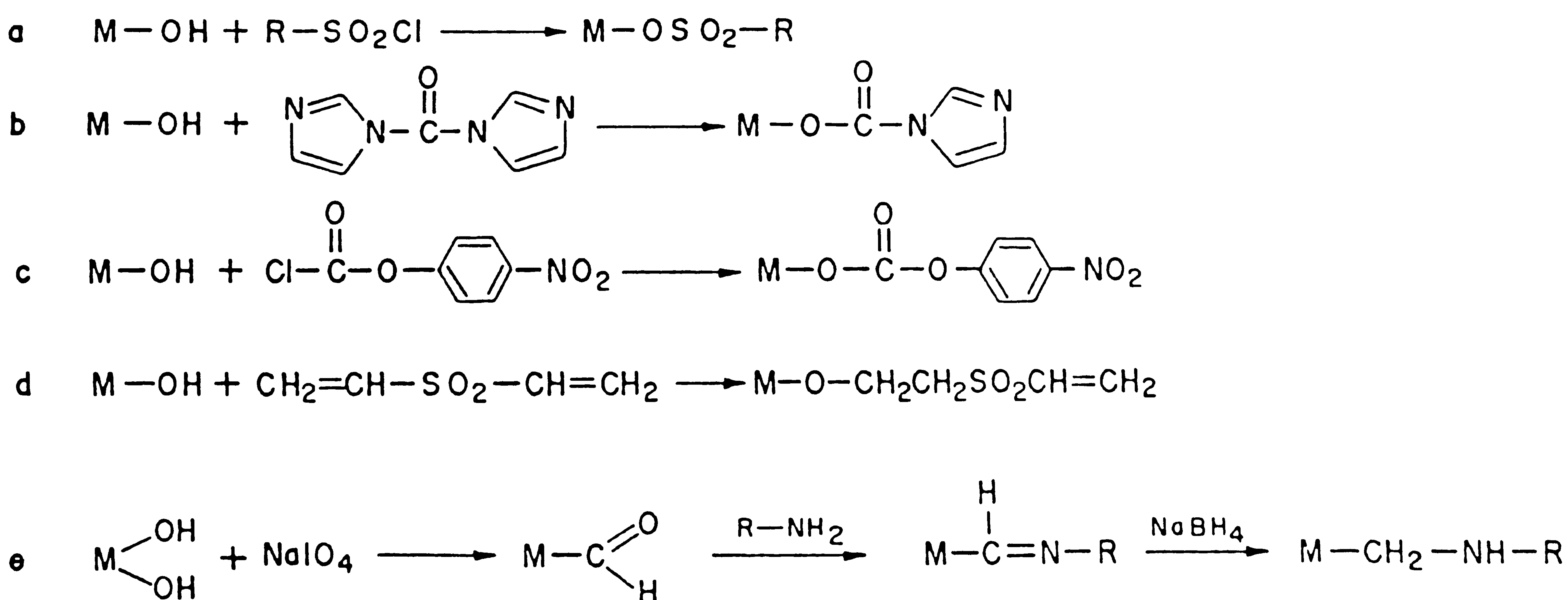



FIGURA VII-7 Métodos alternativos de ativação de matrizes polissacarídicas
a: ativação pelo cloreto de sulfonila
b: ativação com carbonildiimida
c: ativação com p-nitroclorobenzonato (cloroformatos)
d: ativação pela divinilsulfona
e: ativação pelo periodato de sódio (há necessidade de outras etapas para a ativação se completar).

4.2. Ativação de matrizes não hidroxílicas

4.2.1. Poliacrilamida

As matrizes poliacrilamida apresentam em sua estrutura cadeias laterais amidas que são normalmente inertes. A ativação dessas matrizes envolve a transformação do grupo amida em carboxílico, por hidrólise ácida ou alcalina, em acil hidrazida, por reação da amida com hidrazida, e em aminoetil por reação com etilenediamino. A *Figura VII-8* mostra os derivados procedentes da ativação da matriz de poliacrilamida.

FIGURA VII-8 Métodos de ativação da matriz de poliacrilamida.

4.2.2. Ativação de matriz inorgânica silanizada

O vidro de porosidade controlada, para ser empregado como matriz em cromatografia por bioafinidade, deve ser silanizado por tratamento com um composto organosilano, o qual contém um grupo funcional orgânico e um grupo sililalcóxi. A *Figura VII-9a* mostra o processo de silanização. Os organosilanos empregados incluem epoxi, vinil, sulfidril, alquilamina, alquilcloro e fenilsilanos.

Os derivados silanizados são preparados por três diferentes procedimentos:

a. preparação do derivado arilamina a partir do alquilaminosilano, por reação com cloreto de p-nitrobenzoil, seguido por redução do grupo nitro por ditionito de sódio *(Figura VII-9b)*.

b. preparação do derivado carboxílico por reação do alquilaminosilano com ácido succínico.

c. preparação do aldeído ativo do alquilaminosilano, por reação com glutaraldeído.

FIGURA VII-9 Silanização da superfície do vidro poroso e subseqüente ativação com derivado arilamina.

4.3. Acoplamento do ligante à matriz ativada

A matriz, após ativação, está pronta para receber o ligante específico ou o espaçador (braço), quando este se faz necessário.

O acoplamento de ligantes específicos pode ser realizado diretamente na matriz ativada ou em grupos funcionais de moléculas espaçadoras ligadas à matriz. Dependendo do tipo de matriz ativada e do agente ativador, os principais grupos funcionais disponíveis para o acoplamento são os grupos carboxílicos, aminas, tióis, imidazóis e derivados sulfonados.

A *Figura VII-10* mostra exemplos de reações de acoplamento de ligantes específicos diretamente à matriz ativada.

a

$$M-R-COOH + R_1N{=}C{=}NR_2 \longrightarrow M-R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-\overset{H}{\overset{|}{C}}(NHR_1)(NHR_2)$$

$$\downarrow \text{LIGANTE}-NH_2$$

$$R_1NH\underset{\underset{O}{\|}}{C}NHR_2 + M-R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-\text{LIGANTE}$$

b

$$M-O-SO_2-R + H_2N-\text{LIGANTE} \longrightarrow M-NH-\text{LIGANTE} + HO-SO_2-R$$

$$M-O-SO_2-R + HS-\text{LIGANTE} \longrightarrow M-S-\text{LIGANTE} + HO-SO_2-R$$

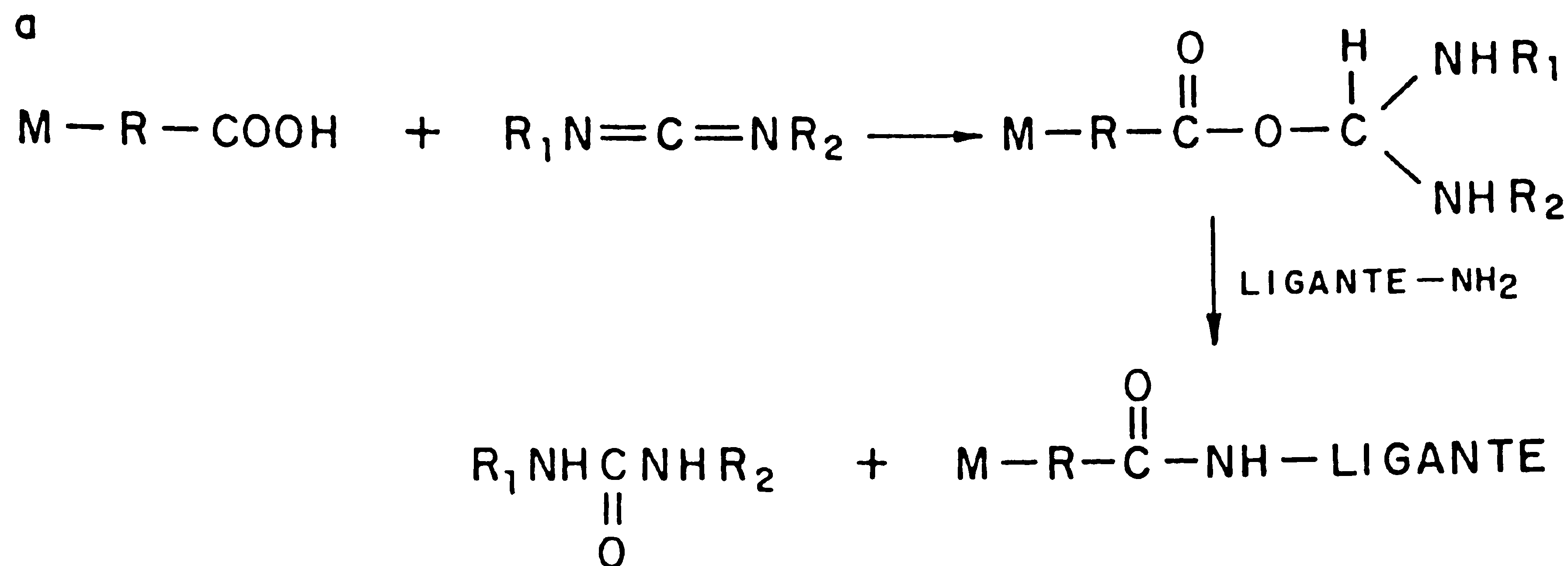



FIGURA VII-10 Exemplos de reações de acoplamento de ligantes específicos diretamente à matriz ativada.

As reações de acoplamento são efetuadas geralmente em meio levemente alcalino (pH 8-9), empregando-se tampão borato ou bicarbonato. Os tampões trishidroxiaminometano e glicina e os sais de guanidina não devem ser utilizados, pois contêm grupos nucleofílicos que reagem competitivamente com a matriz ativada. Os tampões devem apresentar alta força iônica para prevenir ou minimizar as interações que podem ocorrer entre moléculas de ligantes de alta massa molecular.

O tempo de reação de acoplamento é de poucas horas, à temperatura ambiente (25°C), aumentando para 15-20 horas, à temperatura mais baixa (4°C).

A eficiência do processo de acoplamento, de modo geral, aumenta com a concentração do ligante. A literatura mostra que a concentração ideal de ligante para um acoplamento eficaz, sem os efeitos secundários indesejáveis como, por exemplo, adsorção não específica, é de 1-10 moles de ligante por mol de matriz ativada.

4.3.1. Seqüência típica de eventos para o acoplamento do ligante

A *Tabela VII-2* mostra uma seqüência típica de etapas durante a fase de acoplamento do ligante à matriz ativada. Para melhor compreensão, cada fase é exemplificada com uma aplicação específica.

Tabela VII-2

Seqüência de etapas da fase de acoplamento do ligante à matriz ativa.

Etapa	Exemplo relativo a AH-Sepharose 4B ativada
Pesar a quantidade necessária da matriz	1 g da matriz ativada que resulta em 3,5 mL de gel (base de cálculo)
Lavar em funil de placa sinterizada	Usar HCl 1mM para a lavagem na razão de 200 mL/g da matriz
Dissolver o ligante usado no tampão escolhido	Tampão bicarbonato 0,1 M a pH 8,0. 2-3 mg ligante por g da matriz
Misturar a solução do ligante com a suspensão do gel	1 h à temperatura ambiente ou 4h a 4°C. Usar agitador pendular ou similar
Lavar para eliminar o excesso do ligante com vários tampões. Durante o processo de lavagem deve-se, por intermédio de uma reação específica, observar se o ligante está sendo liberado. O processo deve continuar até não ser observada a liberação do ligante.	Tampão usado no acoplamento seguido de tampão pH alto (TRIS 0,05 M a pH 8,0, sendo 0,5 M em NaCl) e depois de pH baixo (formato 0,05 M a pH 4,0, sendo 0,5 M em NaCl).
Transferir para a coluna ou armazenar a 4-8°C.	

5. METODOLOGIA OPERACIONAL

5.1. Preparação da coluna

Selecionado o conjunto matriz-ligante conveniente, não há recomendações especiais na montagem da coluna para a cromatografia por bioafinidade, principalmente para aquelas que usam matrizes de polissacarídeos, podendo ser seguidas as técnicas mencionadas nos capítulos V e VI. Deve ser considerada a possibilidade de adsorção da substância-alvo (aquela a ser isolada) ao tubo cromatográfico. Assim, o plástico é uma alternativa melhor que o vidro, em alguns casos, já que este pode adsorver, preferencialmente certos tipos de macromoléculas, como as proteínas. Tubos de aço inoxidável são usados como colunas de aplicações industriais, assim como em cromatografia líquida de alta eficiência. Outro fator a ser observado é a resistência ao solvente, quando do uso de sistemas de eluição não aquosos.

5.2. Dimensões da coluna

Normalmente são utilizadas colunas pequenas, já que a substância a ser cromatografada é seletivamente retida (1-2 cm da camada superior do gel).

Dimensões típicas de colunas cromatográficas por bioafinidade são de 3,0 x 0,8 cm ou 5,0 x 0,5 cm embora na literatura encontra-se uma grande variedade de dimensões convenientes para cada aplicação.

Um estudo detalhado do efeito das dimensões da coluna neste tipo de cromatografia foi realizado por LOWE, HARVEY e DEAN. Segundo estes autores, a geometria da coluna, a concentração e a quantidade do ligante são fatores fundamentais que se inter-relacionam e determinam a capacidade e a força de interação. Em baixas concentrações do ligante há um efeito pronunciado das dimensões da coluna que tende a diminuir significativamente em concentrações maiores.

5.3. Determinação da capacidade

A capacidade real de uma coluna utilizada em cromatografia por bioafinidade é determinada nas condições experimentais, passando por esta uma certa quantidade da substância a ser retida e verificando a quantidade desta substância recuperada no eluato.

Para exemplificar, suponha que sejam aplicadas à uma fase estacionária seletiva 10 unidades de uma enzima e que nas condições operacionais empregadas para eliminação do material não-ligado sejam recuperadas 2 unidades dessa enzima no eluato. A quantidade de enzima efetivamente ligada à fase estacionária seletiva corresponde à diferença entre o material aplicado e o eluído no tampão de lavagem.

5.4. A preparação da amostra

A amostra pode ser dissolvida no tampão em que vai se iniciar o processo cromatográfico. O volume da amostra a ser aplicada não é crítico se a substância que se quer isolar é fortemente ligada à fase estacionária seletiva, nas condições em que se executa o processo. No entanto, para substâncias que são moderadamente ou fracamente ligadas a essa fase, deve ser utilizado pequeno volume de amostra, em torno de 5% do volume da coluna, prevenindo uma co-eluição com substâncias que não são ligadas.

5.5. O efeito de vazão e temperatura

A vazão deve ser otimizada desde que, quando alta, pode diminuir a eficiência da ligação entre o ligante e a substância-alvo. O efeito da vazão é mais evidente em pequenas colunas com baixa afinidade da substância que se quer reter. Na *Figura VII-11* pode-se avaliar o efeito da vazão na capacidade de uma coluna por bioafinidade, fixados os parâmetros como dimensão da coluna, temperatura e concentração do ligante.

O efeito da temperatura na capacidade da cromatografia por bioafinidade é notável. Em geral, com o aumento da temperatura ocorre uma diminuição na afinidade da substância alvo pela fase estacionária seletiva, o que pode ser utilizado para eluir a substância desejada da coluna, desde que isto não provoque mudanças funcionais irreversíveis na molécula que está sendo cromatografada, isto é, não cause a desnaturação desta substância.

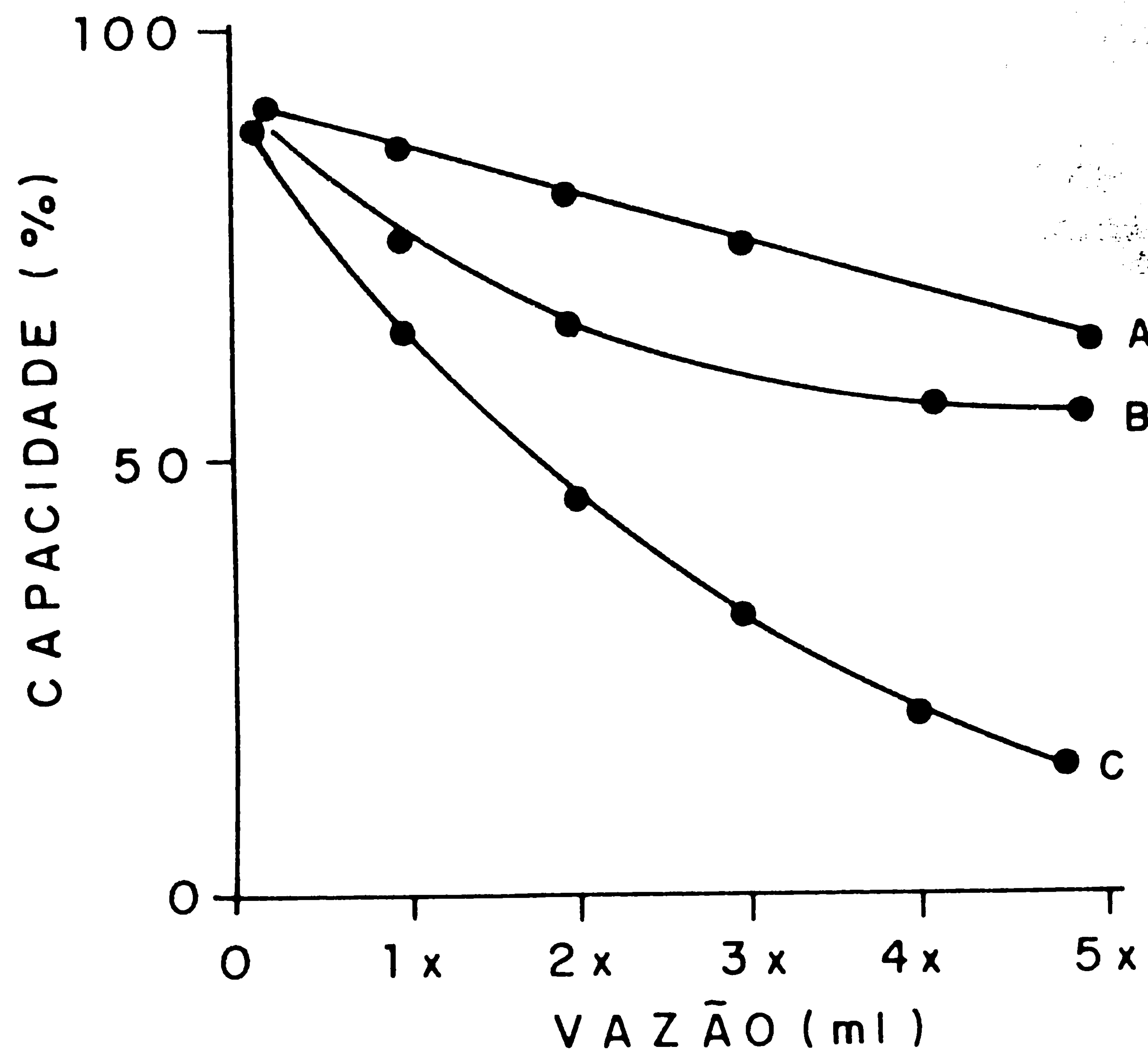



FIGURA VII-11 Dependência da capacidade de uma coluna por bioafinidade em função da vazão. A, B e C são substâncias que podem ser retidas na coluna e são afetadas diferentemente.

5.6. Métodos de eluição

A eluição do material ligado à fase estacionária seletiva em cromatografia por bioafinidade é realizada por emprego de agentes específicos como não específicos. Essa etapa é de fundamental importância para ter-se uma boa separação da substância-alvo.

5.6.1. Agentes de eluição específicos

O deslocamento de substância-alvo da fase estacionária seletiva por agentes específicos é baseado na ligação preferencial dessa substância ao agente específico do que ao ligante da fase estacionária. Geralmente, os agentes de eluição específicos apresentam estruturas químicas semelhantes ao ligante da fase estacionária. Assim, uma enzima poderá ser retida seletivamente pelo uso de uma fase estacionária que tem como ligante específico o substrato da enzima. Desta forma, o deslocamento da enzima da fase estacionária será realizado pela adição ao tampão, de agentes específicos como o próprio substrato, um inibidor ou um modificador alostérico desta enzima.

Dependendo do tipo da substância-alvo retida no conjunto matriz-ligante poderão ser usadas substâncias como inibidores competitivos, cofatores, haptenos (pequenas moléculas que podem interagir com o anticorpo) ou o próprio ligante para o deslocamento desta substância. No caso da utilização do próprio ligante, haverá uma competição entre o ligante unido à matriz e o ligante em solução pela substância-alvo, promovendo a sua eluição.

Na *Figura VII-12* é mostrado um cromatograma referente à cromatografia por bioafinidade de D-eritrodihidroneoptiaina trifosfato sintetase, cuja eluição é efetuada pelo agente específico trifosfato de guanidina, (GTP) substrato para a enzima mencionada.

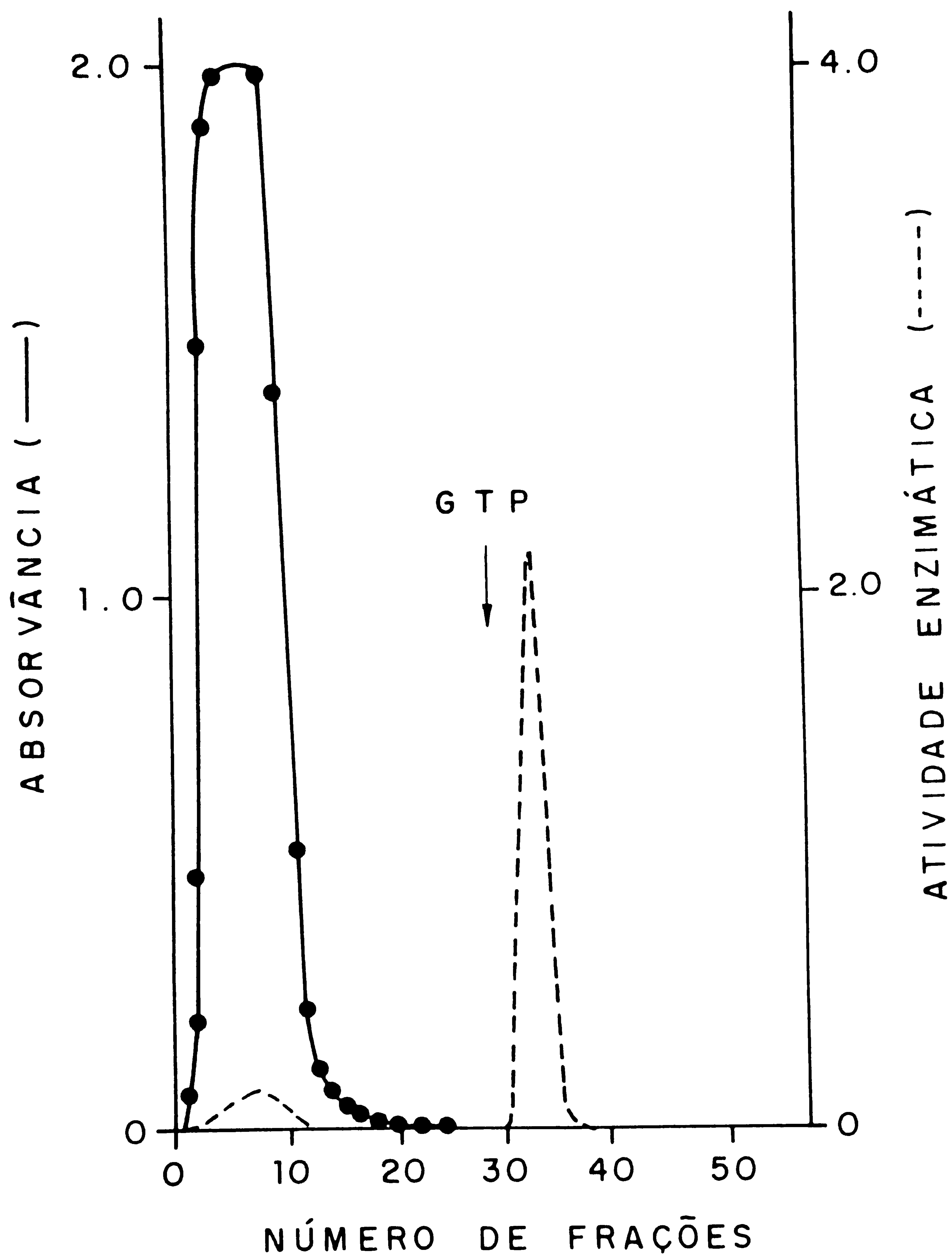



FIGURA VII-12 Isolamento da D-eritrodihidroneoptiaina trifosfato sintetase por cromatografia por bioafinidade. Matriz: agarose; Ligante: GTP; Tampão Inicial: fosfato 0,05 M; pH: 6,8; Coluna: 8,5x1,0 cm.

A mistura de substâncias pré-purificadas, que contêm a enzima D-eritrohidroneoptiaina trifosfato sintetase, é aplicada à fase estacionária seletiva equilibrada em tampão fosfato 0,05 M a pH 6,8. Nesta condição, a enzima é retida ao conjunto matriz (agarose)-ligante (GTP). Efetuando-se a lavagem da referida fase estacionária com o tampão acima mencionado ocorre a eluição de substâncias não-ligadas. Quando o GTP é adicionado ao tampão observa-se o deslocamento da enzima D-eritrodihidroneoptiaina trifosfato sintetase.

5.6.2. Agentes de eluição não específicos

A formação do complexo substância-alvo com ligante específico da fase estacionária envolve, geralmente, ligações fracas como interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio isoladas ou em conjunto.

A variação do pH e/ou força iônica do tampão de eluição pode provocar alterações no complexo macromolécula-ligante específico por ionizar ou modificar, estruturalmente, moléculas que participam do complexo.

Usualmente, são utilizadas para a eluição variações de pH ou da concentração salina, ambas crescentes ou decrescentes, quer em etapas discretas ou em gradientes. A *Figura VII-13* ilustra a eluição de uma coluna por bioafinidade, utilizada para a purificação da proteinase neutra obtida do filtrado de cultura de **Clostridium histoliticum**. A eluição da enzima é efetuada por mudança de pH e de força iônica.

ABSORVÂNCIA (—)
ATIVIDADE ENZIMÁTICA (- - -)
0.6
0.3
0
2.0
1.0
0
1
2
3
0 10 20 30 40 50 60
NÚMERO DE FRAÇÕES

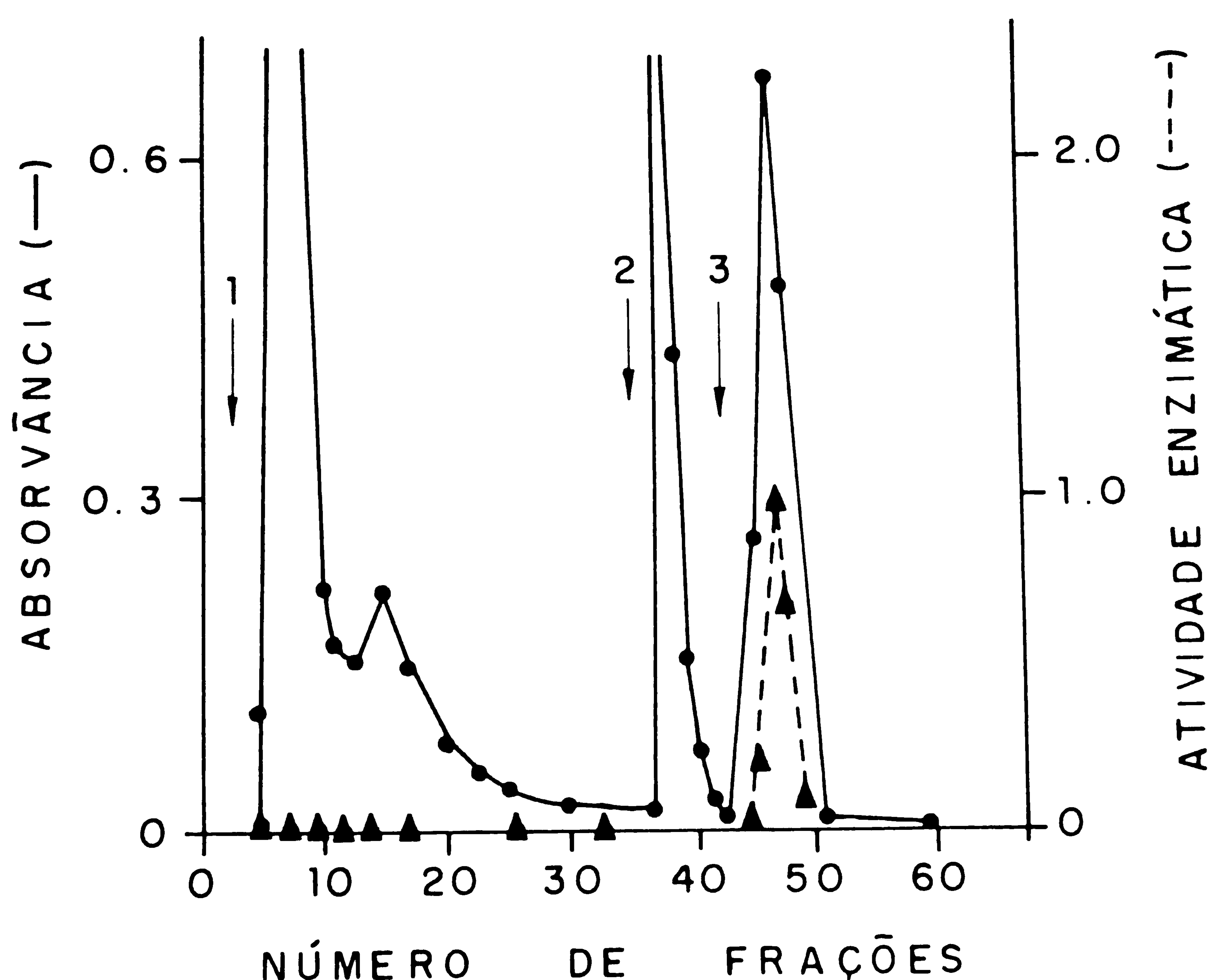



FIGURA VII-13 Eluição em uma coluna "Sepharose-Cap-Leu-Gly" na purificação de proteinase neutra usando diferentes tampões com forças iônicas variáveis.
Tampão 1: TRIS-HEPES 1 mM a pH 7,2 contendo 1 mM $CaCl_2$
Tampão 2: tampão 1 + 0,1 M de NaCl
Tampão 3: TRIS 0,05m a pH 10,0, contendo 1 mM $CaCl_2$
Cap = caproil; Leu = Leucina; Gly = glicina.

5.6.3. Agentes caotrópicos

Quando alterações na força iônica ou no pH do tampão eluente ou, ainda, o uso de reagentes específicos forem ineficazes para o deslocamento da substância-alvo do conjunto suporte-ligante, pode ser adicionadas ao tampão eluente substâncias que causem a desnaturação de macromoléculas (agentes caotrópicos). Estas substâncias deformam a estrutura da macromolécula e, desta forma, influenciam na estabilidade de sua

ligação com o conjunto matriz-ligante. Pela própria natureza destas substâncias, elas devem ser usadas com cautela para evitar desnaturação irreversível. Após a eluição de uma substância-alvo com um reagente específico, deve-se removê-lo por meios adequados (diálise, ultrafiltração). Como exemplos de reagentes caotrópicos pode-se citar: a uréia, o cloreto de guanidina, percloratos, tiossulfatos e iodetos em concentrações molares elevadas.

5.6.4. Outros agentes de eluição

A eluição da substância-alvo também pode ser realizada por mudança gradual de temperatura, dessorção eletroforética ou ainda destruição do "braço" espaçador, quando este for empregado.

A eluição eletroforética foi desenvolvida como uma opção para a técnica que utiliza substâncias caotrópicas para a remoção de substâncias carregadas das matrizes. A técnica baseia-se no fato de que algumas macromoléculas (em especial, as proteínas) adquirem determinadas cargas em valores de pH definidos e, desta maneira, podem migrar em direção a um eletrodo apropriado, já que as forças envolvidas na bioafinidade não são suficientemente fortes para impedir a migração desejada. Maiores detalhes desta técnica podem ser vistos nos trabalhos de MORGAN e col.

Um aumento de temperatura também tende a provocar uma diminuição da capacidade de retenção da fase estacionária seletiva por bioafinidade. Este fato pode ser usado para eluir substâncias que apresentam baixa afinidade pela matriz. A *Figura VII-14* mostra um caso específico de duas substâncias que são separadas por serem afetadas diferentemente pela temperatura.

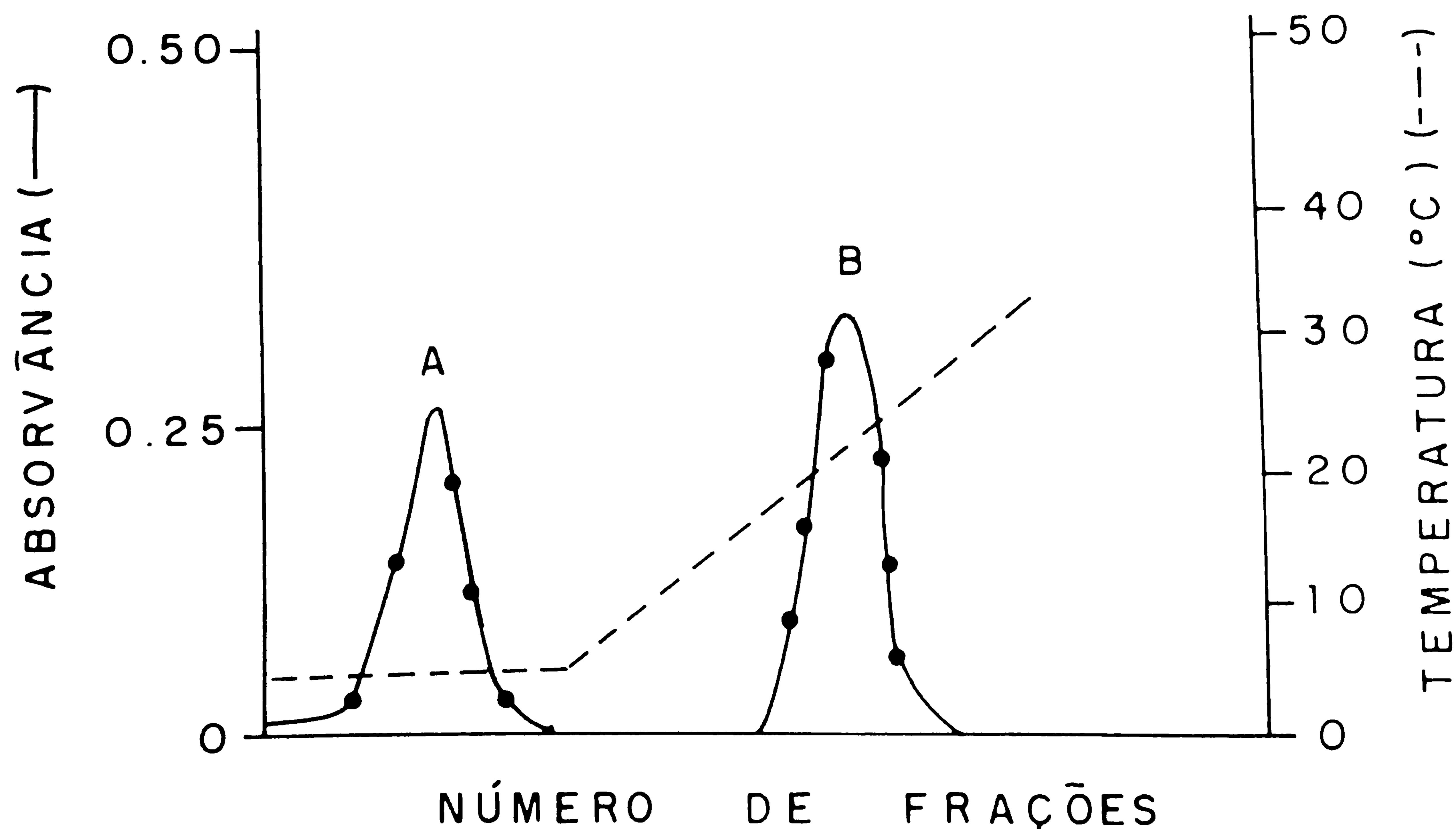



FIGURA VII-14 Eluição de duas substâncias afetadas diferentemente pela temperatura em uma coluna por bioafinidade. A separação é de enzimas (hexoquinase e gliceroquinase) por influência de um gradiente linear de temperatura utilizando como ligante o 5'-AMP.

Em geral, o efeito da temperatura é utilizado em combinação com os outros reagentes mencionados na eluição de substâncias-alvo ligada à fase estacionária seletiva.

A *Tabela VII-3* mostra alguns exemplos de fase estacionária seletiva com os seus respectivos eluentes. Como pode ser observado, a cromatografia por bioafinidade emprega os mais variados eluentes ou associações destes, cujo limite está na criatividade do pesquisador.

Tabela VII-3

Exemplos de sistemas de bioafinidades, evidenciando os eluentes utilizados para dessorver a substância-alvo.

Substância-alvo	Ligante	Eluente
Alonina desidrogenase	NADP	NaCl
Antranilato sintetase	Antranilato	pH (tampão)
Anidrase carbônica	Sulfonamidas	ClO_4^-, I^- e NaCl
Celulase	Celulose	Temperatura
Flavoquinase (Riboflavina Quinase)	Flavinas	Riboflavina
γ-Glutamilcisteína sintetase	ATP, Cestamina	ATP, DTT
3β-hidroxiesteróide oxidase	Colesterol	Triton X-100
Metilmalonil-CoA mutase	Vitamina B12	Vitamina B12
Neuraminidase	Ácido tirosil, Ácido p-nitrofenil oxâmico, Ácido colomínico	pH, Acetato NaCl

NADP: nicotinamida adenina dinucleotide fosfato
ATP: trifosfato de adenosina
DTT: ditiotreitol

6. APLICAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

6.1. Purificação de macromoléculas por cromatografia por bioafinidade

6.1.1. Enzimas

A cromatografia por bioafinidade, após 15 anos de sua introdução, tornou-se o melhor método para a purificação de moléculas biologicamente ativas. Assim, um grande número de proteínas foram purificadas por este método e as enzimas, sem dúvida alguma, são a maior categoria dessas macromoléculas.

As enzimas purificadas através da cromatografia por bioafinidade podem ser divididas em duas categorias: A primeira compreende as enzimas de especificidade restrita, as quais são purificadas com auxílio de inibidores ou substratos. As colunas preparadas com tais ligantes podem ser usadas somente para purificar a enzima específica. Às vezes, fases estacionárias específicas servem para a purificação de atividades catalíticas idênticas, mas derivadas de organismos diferentes. A segunda categoria compreende as enzimas que se ligam a um ligante geral, isto é, um ligante comum para um grande número de proteínas. Um exemplo é o emprego de coenzimas, NAD, NADP, ATP e CoA como ligantes gerais para uma variedade de enzimas que possuem em comum a mesma coenzima. A *Tabela VII-4* mostra alguns exemplos dessas duas categorias de enzimas.

Tabela VII-4

Condições para a cromatografia por bioafinidade para algumas enzimas

Enzima	Ligante	Eluição
	Categoria 1: específicos	
Colina disidrogenase	Colina	Ditiotreitol
Cathepseína	Pepstatina	NaCl
Celulase	Celulose	Temperatura
Glicose-6-fosfatase	Glicose-6-fosfato	KCl
Glutamato decarboxilase	Etilglutamato	NaCl
1-Histidina-2-oxo-glutarato amina-transferase (histidina aminotransferase)	Histidina	NaCl
	Categoria 2: gerais	
ω-hidroxi-ácido graxo-NADP oxidoredutase	NADP	KCl, NADP
Malonil CoA decarboxilase	NADP	NaCl
Endonuclease de restrição	DNA	fosfato, KCl
RNA polimerase	DNA	Sais
Fenilalalina t-RNA sintetase	RNA	KCl-glicerol
Polinucleotideofosforilase	RNA	NaCl

6.1.2. Imunoafinidades

A cromatografia por bioafinidade foi usada inicialmente, e durante muitos anos, para a purificação de anticorpos, empregando antígenos ligados a matrizes ativadas. Recentemente a imobilização de anticorpos monoclonais e policlonais a matrizes ativadas tem permitido a purificação de um grande número de proteínas, incluindo enzimas. Sob condições ideais, colunas com anticorpos ligados à matriz permitem a separação de proteínas específicas de misturas, através de um único passo de purificação. A maior dificuldade no uso de anticorpos imobilizados é a sua alta afinidade por antígenos, necessitando de condições drásticas de eluição, como o uso de agentes caotrópicos (KSCN 5M, uréia 3,5-8M ou guanidina 6M). A *Tabela VII-5* mostra algumas proteínas purificadas por cromatografia por imunoafinidade em coluna com anticorpos ligados à matriz.

Tabela VII-5

Algumas enzimas purificadas por cromatografia por imunoafinidade em coluna com anticorpos ligados à matriz

Enzima	Eluente
Catalase	Glicerol
Kalilcreína	Guanidina
Celulase	pH 2,2
Aminopeptidase	Tris/HCl
Enzima conversora de angiotensina I	$MgCl_2$
Uroquinase	Glicina-HCl
Somastotatina	Ácido acético

6.1.3. Glicoconjugados

Lectinas são proteínas capazes de aglutinar eritrocitos e algumas células malignas, possuindo efeitos mutagênicos e habilidade de unirem-se reversivelmente a sacarídeos. Devido às suas características de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser imobilizadas em matrizes para a purificação de glicoconjugados, que, devido à interação fraca, podem ser deslocados prontamente da coluna em meio neutro. Das muitas lectinas úteis, duas são mais freqüetemente usadas na purificação de carboidratos: Concanovalina A e Recinus communis aglutinina.

As lectinas são geralmente usadas nos estágios iniciais da purificação de glicoproteínas e requerem procedimentos adicionais para completar a purificação.

6.1.4. Receptores

O receptor é uma molécula que reconhece uma entidade química específica, liga-se a esta e inicia uma série de eventos bioquímicos resultando em uma resposta fisiológica característica.

A interação entre hormônio, neurotransmissor ou droga e o respectivo receptor é seletiva e específica. A purificação de receptores pode ser efetuada por cromatografia por bioafinidade via imobilização de hormônios, neurotransmissores ou drogas à matriz ativada. A cromatografia por bioafinidade tem sido empregada para purificação da proteína receptor B-adrenérgico cardíaco e colinérgica, bem como para receptores de insulina de membranas de fígado e células gordurosas.

6.2. Purificação de pequenas moléculas

Métodos clássicos para o isolamento de peptídeos e outras moléculas pequenas são trabalhosos e de baixo rendimento. A purificação por bioafinidade, usando-se macromoléculas insolúveis, freqüentemente permite isolar, em um único passo, um peptídeo presente em uma mistura. O método é grandemente usado na purificação de peptídeos sintéticos e naturais, e no isolamento de peptídeos modificados, obtidos da hidrólise química de proteínas modificadas. Por exemplo, cita-se o isolamento de peptídeos contendo nitroritosina de lisozima e carboxipeptidase A e B modificadas com tetranitrometano.

7. REFERÊNCIAS

7.1. Gerais

- JAKOLY, W.B. e WILCHECK, M. *Methods in Enzymology* vol. XXXIV - Affinity Techniques and Enzyme Purification: Part B. Academic Press, New York, 1974.
- CUATRECASAS, P. *Advances in Enzymology*, A. Meister. ed. John Wiley & Sons, New York, 1972, p. 29.

- WILCHEK, M. e HEXTER, C.S. The Purification of Biologically Active Compounds by Affinity Chromatography, *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 23, D. Glick, John Wiley & Sons, New York, 1978, p. 345
- WILCHEK, M., MIRON, T.e KOHN, J. *Affinity Chromatographyc, em Methods in Enzymology*, vol. 104, W. B. Jakoby, Academic Press, New York, 1984, p. 3.
- BOYER, F.R. *Modern Experimental Biochemistry*. Cap. 3, Secção H, Affinity Chromatography, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, 1986, p. 108.
- DEAN, P.D.G.; JOHNSON, W.S. e MIDDLE, F.A. ed. Affinity Chromatography - a practical approach, IRL Press, Oxford, 1985. - *Affinity Chromatography - principles and methods*, Pharmacia Fine Chemicals. 1979.

7.2. Periódicos

- KRISHNA MALLIA,A.; HERMANSON, G.T.; KROHN, R.I.; FUJIMOTO, E.K. e SMITH., K. Anal. Letters *14*(B8), 649, 1881.
- LOWE, R.C.; HARVEY, M.J. e DEAN, P.D.G. Eur. J. Biochem. *41*, 341, 1974.
- JACKSON, R.J.; WOLCOTT, R.M. e SHIOTA, T. Biochem. Biophys. Res. Comm. *51*, 428, 1973.
- SPARROW, L.G. e MCQUADE, A.B. Biochem. Biophys. Acta *302*, 90, 1973.
- GJERWIN, I.L. e MILSTON, J.B. P.N.A.S. USA *69*, 2599, 1972.
- LOWE, R.C.; HARVEY, M.J. e DEAN, P.D.G. Eur. J. Biochem. *41*, 347, 1974.
- LOWE, R.C.; HARVEY, M.J. e DEAN, P.D.G. Eur. J. Biochem. *41*, 353, 1974.
- LOWE, R.C.; HARVEY, M.J. e DEAN, P.D.G. Eur. J. Biochem. *41*, 335, 1974.
- CUATRECASAS, P.; WILCHECK, M. e ANFINSEN, C.R. Biochemistry *61*, 636, 1968.

CAPÍTULO VIII

CROMATOGRAFIA GASOSA

Pierina Sueli Bonato
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada "Cromatografia Gasosa". A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A amostra, através de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização destas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação destas substâncias.

Algumas técnicas semelhantes à cromatografia gasosa apareceram desde 1930, no entanto, seu desenvolvimento só foi acelerado depois da introdução da cromatografia gás-líquido, em 1952, por JAMES e MARTIN. O interesse pela cromatografia gasosa fez com que houvesse um grande desenvolvimento de equipamentos e métodos e hoje ela tornou-se uma técnica comum, presente na maioria dos laboratórios que utilizam a análise química.

A cromatografia gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Um dos principais motivos que tornam a cromatografia gasosa de uso bastante acentuado é a sua sensibilidade. Dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de 10^{-12}g. Essa sensibilidade faz com que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, o que em certos casos, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. É importante salientar ainda que a cromatografia gasosa é excelente como técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de resultados quantitativos em concentrações que variam de picogramas a miligramas.

Se de um lado a cromatografia gasosa apresenta todas estas vantagens, por outro, apresenta alguns inconvenientes. Esta técnica pode ser empregada na analíse de substâncias voláteis e estáveis termicamente, caso contrário, há necessidade de se formar um derivado com estas características, o que nem sempre é viável. A análise cromatográfica isoladamente é rápida, podendo ser efetuada em minutos. No entanto, na maioria das vezes há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna cromatográfica. Às vezes, esta etapa de preparação é longa e complexa, aumentando em muito o tempo e o custo da análise. Além disso, a cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra. Outro fator negativo refere-se

à possibilidade de utilização da cromatografia gasosa como técnica preparativa, apenas na faixa de microgramas e miligramas.

2. TÉCNICAS USADAS EM CROMATOGRAFIA GASOSA

A técnica de desenvolvimento mais usada em cromatografia gasosa é a eluição. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nesta corrente de gás, ela é arrastada através da coluna. As substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, que gera um sinal para o registrador *(Figura VIII-1)*.

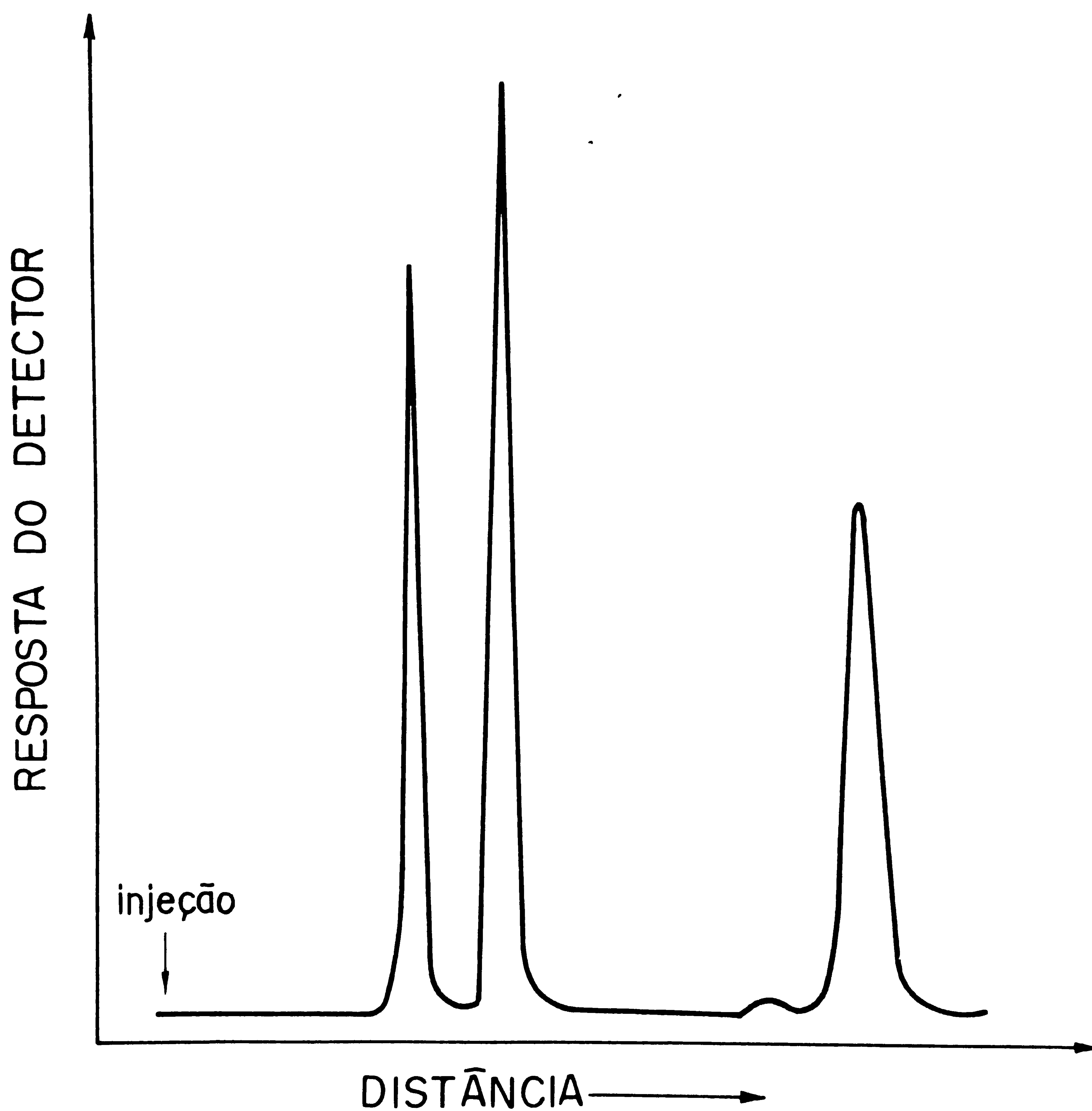



FIGURA VIII-1 Cromatograma fornecido pelo registrador.

Em um cromatograma ideal, os picos apresentam-se separados e simétricos; na prática pode haver sobreposição parcial devido a uma separação deficiente na coluna, ou a presença de picos com assimetria

frontal ou caudas. A assimetria frontal está, freqüentemente, relacionada com um excesso de amostra injetada ou com o uso de colunas em uma temperatura abaixo do ideal para uma determinada análise. As caudas aparecem devido às falhas na técnica de injeção da amostra, ou devido à adsorção excessiva na fase estacionária ou suporte.

Durante a análise, a temperatura da coluna pode permanecer constante (cromatografia gasosa isotérmica) ou sofrer uma variação, linear ou não (cromatografia gasosa com temperatura programada). A programação de temperatura é significativamente importante em cromatografia gasosa, já que melhora a separação e diminui o tempo de análise. Consiste em se começar a análise com a coluna em uma temperatura mais baixa, para que solutos de baixo ponto de ebulição possam eluir como picos separados. Durante a análise, a temperatura da coluna é aumentada com o objetivo de se diminuir a retenção de substâncias de maior ponto de ebulição. Além das vantagens citadas acima, a programação de temperatura faz com que haja uma maior simetria nos picos e uma melhor detectabilidade para aqueles picos com tempos de retenção excessivamente longos sob condições isotérmicas. A programação de temperatura é bastante útil quando a amostra é composta de substâncias com uma grande diferença em seus pontos de ebulição.

De acordo com o tipo de fase estacionária usada, a cromatografia gasosa pode ser classificada em cromatografia gás-sólido e cromatografia gás-líquido.

Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária é um sólido com uma grande área superficial e a separação baseia-se em mecanismos de adsorção das substâncias neste sólido. A cromatografia gás-sólido é usada principalmente na análise de gases permanentes e compostos apolares de baixa massa molecular.

Na cromatografia gás-líquido a fase estacionária é um líquido pouco volátil, recobrindo um suporte sólido ou as paredes de colunas capilares. A separação baseia-se em mecanismos de partição das substâncias entre a fase líquida e a fase gasosa. A utilização da cromatografia gás-líquido corresponde a cerca de 95% do total de aplicações.

3. EFICIÊNCIA

As medidas de separação das substâncias da amostra em cromatografia em coluna já foram definidas no Capítulo I. Aqui será visto um pouco mais sobre eficiência em cromatografia gasosa.

A eficiência de uma coluna é medida em termos de número de pratos teóricos. Um prato teórico corresponde a uma etapa de equilíbrio da substância entre a fase estacionária e a fase móvel; portanto, quanto maior o número de pratos teóricos maior será a eficiência (picos mais estreitos). O número de pratos teóricos é definido por:

$$n = 16\,(d_R \,/\, w_b)^2$$

onde n = número de pratos teóricos

d_R = distância de retenção

w_b = largura do pico na linha da base

Muitos fatores afetam a eficiência de uma coluna, tais como o comprimento, diâmetro interno, temperatura, vazão da fase móvel, volume da amostra, técnica de injeção, características das substâncias, etc. A comparação entre colunas de comprimentos diferentes pode ser feita utilizando a altura equivalente a um prato teórico (h), determinado pela equação:

$$h = L / n$$

onde L é o comprimento da coluna cromatográfica.

A utilização de d'_R em vez de d_R na equação que fornece o número de pratos teóricos resulta no número de pratos efetivos (N). Este representa a eficiência da coluna, de maneira isolada do restante do sistema, evitando assim influências de volume morto no injetor e detector. Em lugar de d_R e d'_R para o cálculo de n e N pode-se usar t_R ou t'_R, respectivamente. Neste caso, w_b deve ser medido em unidades de tempo.

VAN DEEMTER desenvolveu uma equação que relaciona a altura equivalente a um prato teórico, velocidade linear do gás de arraste e fatores que provocam o alargamento de picos. Este estudo foi feito para cromatografia gás-líquido devido a sua maior utilização, sendo:

$$h = A + B/u + Cu,$$

onde a velocidade linear do gás de arraste é $u = L / t_M$, e t_M é o tempo em que as moléculas do soluto ficam na fase móvel.

O termo A refere-se ao alargamento dos picos, devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas da amostra. Em uma coluna recheada, uma molécula pode ter um caminho um pouco diferente da outra, provocando assim o alargamento do pico. Para minimizar o termo A é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheadas e partículas com tamanho pequeno e uniforme.

O termo B está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel, que é proporcional à difusibilidade do soluto neste gás. Quanto maior a capacidade do soluto em se difundir no gás de arraste, maior o alargamento do pico, ocasionando uma perda na eficiência da coluna. O aumento da densidade do gás de arraste, quer seja por um aumento na sua massa molecular ou na pressão, provoca uma diminuição na difusão do soluto. É preferível, quando possível, o uso de nitrogênio ou argônio como fase móvel, devido a suas maiores massas moleculares. A diminuição na velocidade linear do gás de arraste provoca um aumento na largura dos picos, pois, neste caso, o tempo disponível para o soluto se difundir no mesmo é maior.

Quando a fase estacionária é líquida, tem-se um filme recobrindo as partículas do suporte; quanto maior for a espessura deste filme, maior será o termo C e menor será a eficiência da coluna, já que termo está relacionado com a facilidade de transferência de moléculas do soluto da fase estacionária para a fase móvel. Um filme fino de fase líquida com baixa viscosidade (difusibilidade elevada) produz colunas mais eficientes. Para minimizar a contribuição do termo C, há necessidade ainda de se utilizar vazões menores da fase móvel.

A equação anterior é melhor escrita da seguinte maneira:

$$h = 2\lambda\, d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{2}{3}\,\frac{D_m}{(1 + D_m)^2}\,\frac{d_f^2}{D_S}\,u$$

onde:

- h = altura equivalente a um prato teórico
- λ = fator relacionado com irregularidades no recheio
- d_P = diâmetro médio das partículas do suporte
- γ = fator relacionado com as tortuosidades dos canais entre as partículas do suporte
- D_M = coeficiente de difusão do soluto no gás de arraste
- u = velocidade linear do gás de arraste $= L / t_M$
- D_m = razão de distribuição das massas $= t'_R / t_M$
- d_f = espessura do filme líquido
- D_S = coeficiente de difusão do soluto no líquido da fase estacionária

O conhecimento dos fatores que aumentam ou diminuem a eficiência de uma coluna pode ser racionalmente utilizado no sentido de se obter, na prática, uma melhor separação das substâncias analisadas. Assim, a eficiência de uma coluna é melhorada utilizando-se partículas pequenas e de tamanho uniforme; existe um valor ótimo de vazão da fase móvel onde a eficiência da coluna é máxima *(Figura VIII-2)*, devido a contribuição contraditória dos termos B e C da equação de VAN DEEMTER; em geral, o gás de arraste é escolhido de acordo com o tipo de detector usado, no entanto, uma melhor eficiência é obtida com gases de maior massa molecular, como por exemplo, o nitrogênio; a fase líquida escolhida deve ter baixa viscosidade e alta capacidade para dissolver a amostra; menores porcentagens de recobrimento são preferíveis para se obter separações mais rápidas e em menores temperaturas; geralmente, a diminuição da temperatura da coluna melhora a sua eficiência; colunas de menores diâmetros internos são mais eficientes, entretanto, a dificuldade no enchimento destas colunas limita a sua utilização.

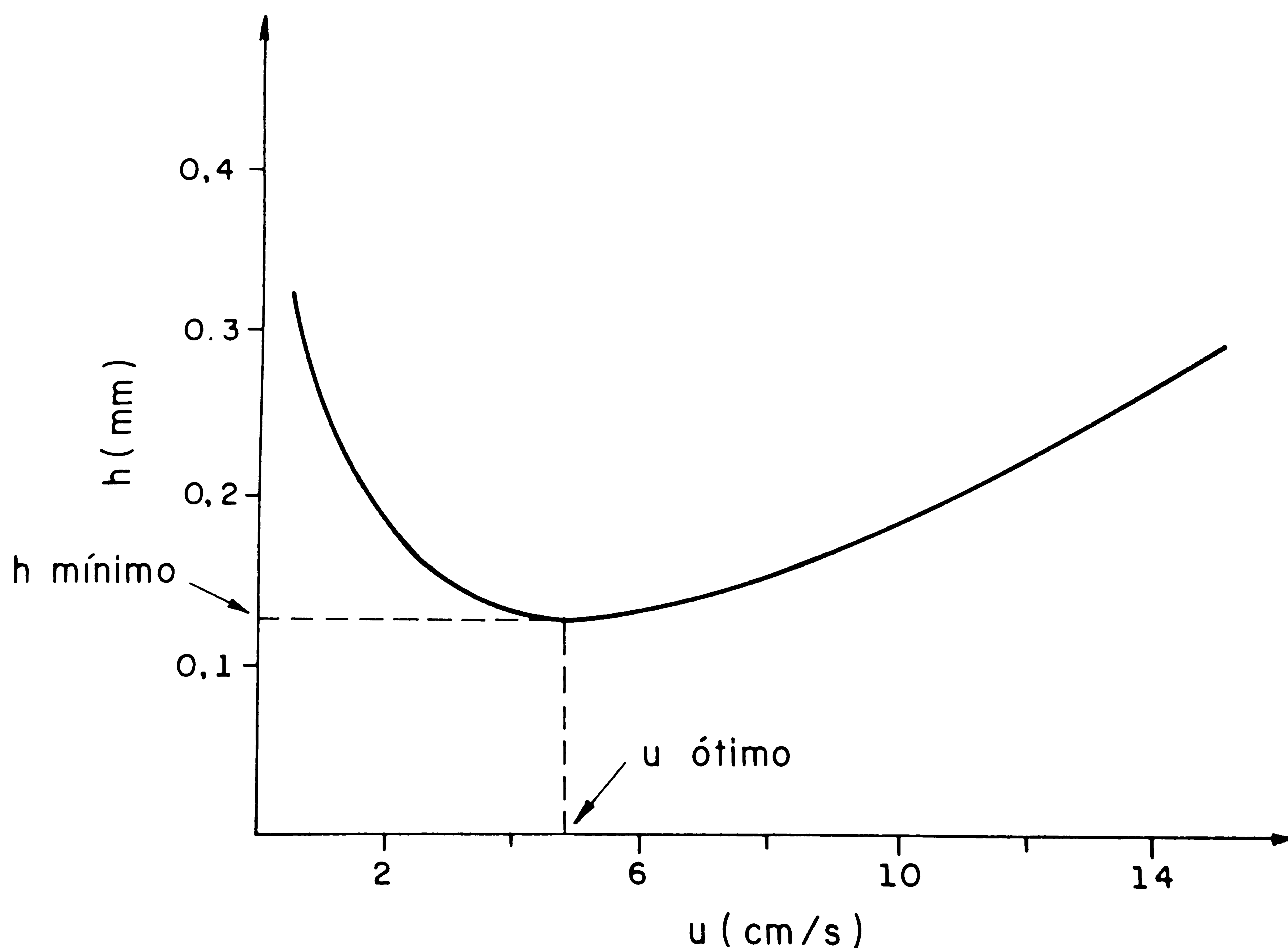



FIGURA VIII-2 Variação de h com a velocidade linear do gás de arraste.

Outros fatores, além destes relacionados com a coluna, podem causar o alargamento de picos. São os chamados fatores extra-coluna como, por exemplo, volume excessivo nas ligações coluna-injetor e coluna-detector. Deve-se, portanto, evitar estes espaços excessivos para obtenção de uma maior eficiência na separação.

4. FASE ESTACIONÁRIA

4.1. Fase estacionária sólida

Na cromatografia gás-sólido, um sólido finamente dividido funciona como fase estacionária. A separação baseia-se na adsorção física e química das substâncias presentes na amostra neste sólido e nas suas volatilidades. Substâncias com a mesma capacidade de serem adsorvidas pela fase estacionária podem ser separadas se apresentarem volatilidades diferentes. Este sólido deve ser constituído de partículas com diâmetros regulares, para que as colunas resultantes apresentem uma maior eficiência. As granulometrias de partículas mais comumente encontradas são: malhas de 40-60, 60-80, 100-120 e 120-140 (ver Apêndice 5).

A cromatografia gás-sólido tem aplicações limitadas devido a alguns fatores negativos. Entre eles pode-se destacar a não linearidade das isotermas de adsorção mesmo com pequenas quantidades de amostra, resultando em picos com caudas, tempos de retenção sujeitos a uma maior variação em função do tamanho da amostra e adsorção irreversível. É importante salientar ainda, a possibilidade de alterações catalíticas da amostra, em presença dos adsorventes a altas temperaturas. A grande área superficial destes adsorventes resulta em tempos de retenção excessivamente longos, particularmente para moléculas grandes e polares.

Se de um lado a cromatografia gás-sólido apresenta todas estas limitações em relação a cromatografia gás-líquido, por outro, apresenta certas vantagens como a maior estabilidade dos adsorventes a maiores temperaturas e ao ataque por oxigênio. Com a maioria das fases empregadas na cromatografia gás-sólido, não existe o problema relacionado com a sangria da coluna (volatilização constante de parte da fase estacionária).

Os principais adsorventes usados em cromatografia gás-sólido são relacionados na *Tabela VIII-1*. Os polímeros porosos como os da Porapak e Chromosorb Century Series são os materiais mais utilizados atualmente. São obtidos pela polimerização de monômeros em presença de um reagente com capacidade de entrecruzamento das cadeias. As características do material obtido dependem da natureza química do monômero, reagente de entrecruzamento e solvente. O Porapak (Millipore-Waters) é essencialmente um polímero do estireno ou etilvinilbenzeno, entrecruzado com divinilbenzeno, formando uma estrutura uniforme, com poros de tamanho específico. Este material pode ser modificado por copolimerização com vários outros monômeros polares, para produzir adsorventes de polaridades diferentes. Os polímeros porosos da Chromosorb Century Series (Johns Manville) possuem características equivalentes. Estes polímeros têm sido usados para a separação de compostos apolares e polares de baixa massa molecular e gases permanentes. Uma propriedade importante deste tipo de material é a eluição de água e outros solutos polares como picos, cuja assimetria é quase desprezível.

Tabela VIII-1

Alguns sólidos usados como fase estacionária em cromatografia gasosa

Fase estacionária	Aplicação
Polímeros porosos	Gases permanentes e compostos apolares ou polares de cadeia curta
Carvão grafitinizado	Osômeros estruturais e geométricos
Sílica	Gases permanentes e hidrocarbonetos de baixo ponto de ebulição
Alumina	Hidrocarbonetos

Carvão grafitinizado pode ser preparado por aquecimento de carvão a temperatura de 3000°C em atmosfera inerte, gerando um material cuja superfície é praticamente livre de ligações insaturadas, radicais livres e íons. A retenção da amostra neste material é feita nos sítios apolares, que praticamente não possuem qualquer tendência em atrair moléculas com grupos funcionais, e em sítios polares, que, embora presentes em pequenas quantidades, podem estabelecer interações fortes e específicas com solutos polares.

Os adsorventes baseados em sílica são obtidos em uma grande faixa de área superficial específica e diâmetro de poros. Juntamente com a alumina, são recomendados para a separação de hidrocarbonetos insaturados e saturados de baixa massa molecular, hidrocarbonetos halogenados e derivados do benzeno. Solutos polares são eluídos muito lentamente e os picos obtidos são, geralmente, assimétricos, devido à forte interação com os grupos polares existentes na superfície deste tipo de adsorvente. A retenção em sílica e alumina depende da área superficial específica, da presença de contaminantes polares na superfície do adsorvente e, também, da capacidade da substância em sofrer interações específicas como, por exemplo, a formação de pontes de hidrogênio.

4.2. Fase estacionária líquida

Um líquido pouco volátil, recobrindo um suporte sólido, funciona como fase estacionária. Este líquido deve solubilizar as substâncias presentes na amostra de maneira seletiva, para que não haja a eluição das mesmas sem a devida separação. Além disso, a fase estacionária deve ser termicamente estável e quimicamente inerte às substâncias na temperatura de uso. A separação das substâncias presentes na amostra baseia-se nas suas diferentes solubilidades na fase estacionária e nas suas diferentes volatilidades. As forças de interação molecular entre as substâncias a serem separadas e a fase estacionária podem ser classificadas em:

a. Forças de orientação - São forças resultantes da interação entre dois dipolos permanentes e são reduzidas com o aumento da temperatura.
b. Dipolo induzido - A interação ocorre entre um dipolo permanente e um dipolo induzido. Esta força é muito pequena, porém, um grande número de separações depende dela; de maneira geral, a ação desta força é diminuída com o aumento da temperatura.
c. Dispersão - São forças que ocorrem entre todas as moléculas, devido à formação de dipolos instantâneos. Estas forças são fracas e independentes da temperatura.
d. Forças de interação específica - São forças que resultam da ligação química, formação de complexos, pontes de hidrogênio, etc., entre moléculas das substâncias e da fase estacionária.

Um suporte ideal deve possuir uma área superficial específica suficientemente grande para permitir que a fase estacionária se espalhe de maneira uniforme formando um filme fino. Além disso, as partículas deste suporte devem possuir diâmetros regulares e poros uniformes, bem como apresentarem rigidez mecânica para evitar possíveis quebras durante a sua utilização. Idealmente, o suporte não deve interagir com as moléculas da amostra. Para atender a estas necessidades, os suportes sofrem uma série de tratamentos antes de serem utilizados:

a. Seleção de uma faixa de diâmetro de partículas adequada, usando peneiras especiais.
b. Remoção dos centros ativos por saturação com a fase estacionária ou por reação com agentes silanizantes (diclorodimetilsilano, hexametildisilazano), ácidos (HCl e HNO_3), ou bases (KOH, $NaOH$).

c. Recobrimento do suporte com materiais não polares, como, por exemplo, um filme metálico (prata, ouro) ou plástico.

Como já foi indicado anteriormente, a eficiência de uma coluna é aumentada pela utilização de partículas de menor diâmetro. No entanto, a diminuição no diâmetro das partículas gera uma maior resistência ao fluxo da fase móvel; na prática, utilizam-se partículas com malha de 80 - 100 ou 100 - 120.

O mais extensivo tratamento químico, incluindo a silanização, não pode remover por completo os sítios ativos, o que provoca o aparecimento de picos assimétricos quando se analisa substâncias fortemente ácidas ou básicas. Para contornar esta dificuldade podem-se adicionar agentes redutores de caudas. Aminas podem ser eluídas na forma de picos simétricos pela adição de hidróxido de sódio, polietilenoimina ou polipropilenoimina. Para a eluição de substâncias ácidas pode-se adicionar ácido fosfórico. Estes modificadores são adicionados ao suporte antes da fase estacionária ser incorporada ao mesmo.

Os suportes mais usados atualmente são baseados em terras diatomáceas. São esqueletos silicosos de diatomáceas aquáticas transformadas geologicamente em um material poroso. Este material é essencialmente sílica microamorfa, contendo pequenas quantidades de alumina e óxidos metálicos como impurezas. Este material é muito frágil para ser usado como suporte, sendo necessária a sua calcinação em temperaturas maiores que 900°C, de tal modo a se conseguir rigidez mecânica adequada. Quando esta calcinação é efetuada na presença de carbonato de sódio,o suporte obtido é branco, caso contrário apresenta coloração rosa. O exemplo mais comum de suportes baseados em terras diatomáceas são os Chromosorb. Os suportes de cor rosa, como Chromosorb P e A, são mais duros, possuem uma maior densidade de empacotamento, maior área superficial e maior capacidade. Podem ser usados com fins analíticos ou preparativos. Os suportes brancos, como o Chromosorb W e G, são mais frágeis, menos densos e possuem uma menor área superficial e capacidade, sendo utilizados principalmente em colunas analíticas.

O teflon também tem sido usado como suporte. Sendo bastante inerte, torna possível a análise de compostos corrosivos e altamente polares; no entanto, as colunas obtidas são menos eficientes devido à dificuldade de adesão da fase líquida neste suporte, e sua baixa resistência mecânica.

Existem centenas de líquidos disponíveis comercialmente que podem ser usados como fase estacionária em cromatografia gás-líquido. Estes líquidos devem ser termicamente estáveis e sua volatilidade ou pressões de vapor devem ser desprezíveis na temperatura de análise. Devem, ainda, ser seletivos para as substâncias presentes na amostra e não devem interagir de maneira irreversível com estas.

A volatilidade da fase estacionária determina a temperatura máxima em que ela pode ser usada. Acima desta temperatura ocorre uma perda da fase líquida (sangria), que pode afetar a análise devido à detecção dos compostos eluídos, e provoca uma diminuição no tempo de vida da coluna. A perda da fase líquida por volatilização é um fato bastante indesejável quando se usa programação de temperatura. Algumas fases estacionárias líquidas, em baixas temperaturas, apresentam uma fase de transição sólido-líquido que impõe um limite inferior de temperatura de uso.

Devido ao grande número de fases líquidas disponíveis, tornou-se necessário o uso de certos métodos para classificá-las. Geralmente, são usados os números de ROHRSNEIDER ou McREYNOLDS, determinados a partir do índice de retenção de KOVATS.

O índice de retenção de KOVATS, I, é definido como cem vezes um número hipotético, que é igual ao número de átomos de carbono de um alcano saturado de cadeia normal, que tem o mesmo tempo de retenção ajustado (t'_R) que o composto, cujo índice está sendo determinado. O índice de retenção pode ser determinado, usando-se um gráfico, que relaciona o número de átomos de carbono de alcanos saturados normais com o logaritmo dos tempos de retenção ajustados destes alcanos *(Figura VIII-3)*, ou pelo cálculo, aplicando a equação:

$$I = 100z + 100 \left(\frac{\log t'_{Rx} - \log t'_{Rz}}{\log t'_{R(z+1)} - \log t'_{Rz}} \right)$$

onde: t'_{Rx} = tempo de retenção ajustado do composto x

t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que t'_{Rx} é intermediário a t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$.

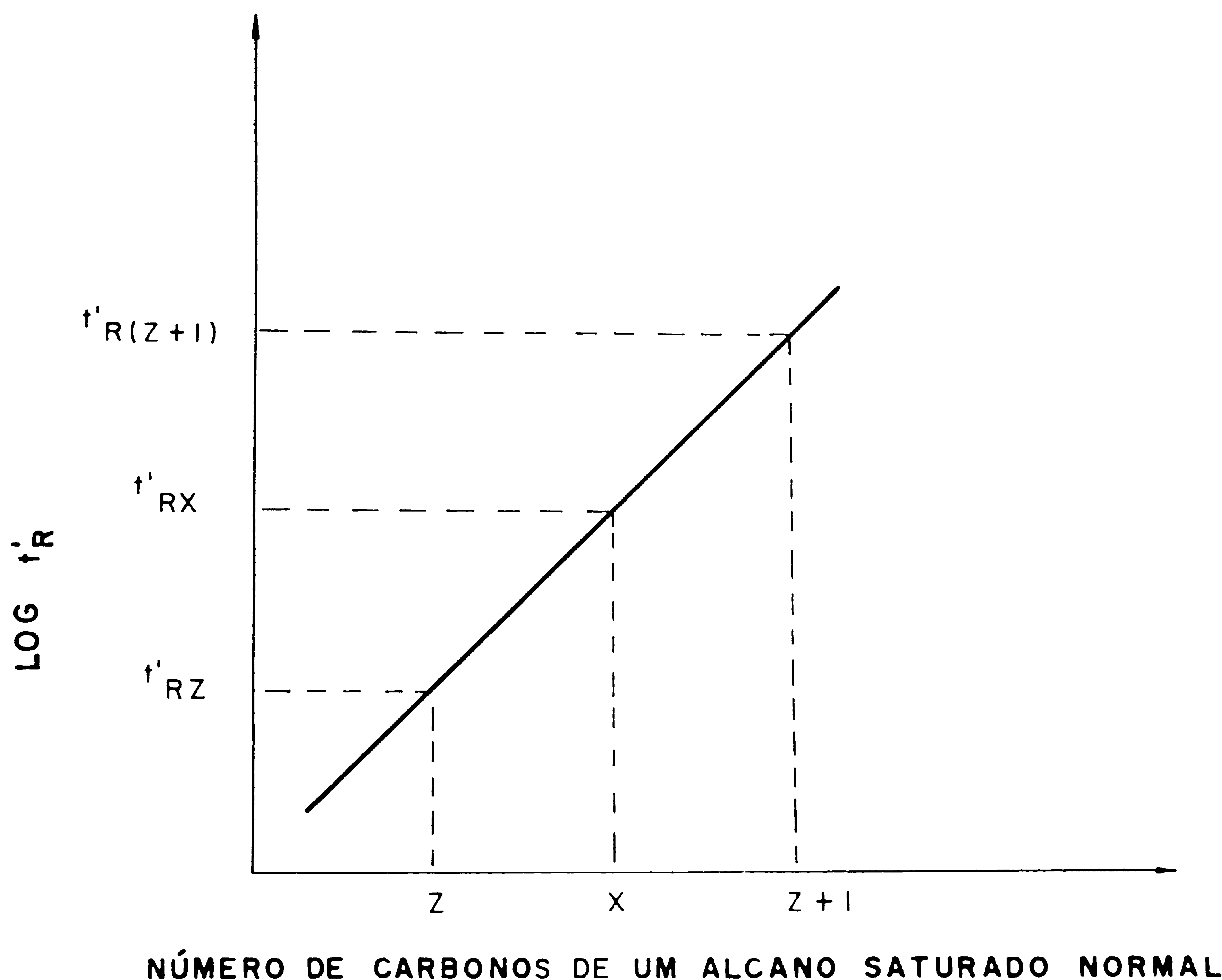



FIGURA VIII-3 Determinação do índice de retenção para um composto, X, com tempo de retenção ajustado, t'_{RX}. O índice de retenção do composto X é cem vezes o valor X lido na abscissa.

A comparação entre o índice de retenção para um dado composto em uma coluna com fase estacionária apolar e em outra com fase estacionária polar está relacionada com a polaridade da fase estacionária. Geralmente, a fase estacionária apolar é o esqualano, tomado como padrão:

$$\Delta I = I\,(\text{polar}) - I\,(\text{apolar})$$

Quanto maior o valor de ΔI, maior será a polaridade da fase estacionária analisada.

ROHRSNEIDER determinou o valor de ΔI para benzeno, etanol, 2-butanona, nitrometano e piridina, para diversas fases estacionárias, usando esqualano como fase apolar. Os números de McREYNOLDS são determinados usando-se alguns outros compostos para a determinação dos índices de retenção. Estas determinações são feitas em iguais condições experimentais (20% de fase em Chromosorb W-AW, malha 80-120, a 120°C).

A *Tabela VIII-2* relaciona, a título de exemplificação, algumas fases estacionárias líquidas. Nos livros referenciados no final deste capítulo, o leitor poderá encontrar tabelas mais completas.

Tabela VIII-2

Fases estacionárias líquidas com suas correspondentes temperaturas limites de operação e números McReynolds.

Fase estacionária	Temp. máx. (°C)	Números de McReynolds*				
		x'	y'	z'	u'	s'
Apiezon L (Hidrocarboneto)	250	32	22	15	32	42
Carbowax 1540 (polietilenoglicol, PEG)	175	371	639	453	666	641
Carbowax 20M (PEG)	225	322	536	368	572	510
DEGS (succinato de dietilenoglicol)	180	496	746	598	837	835
DC-11 (metilsilicone, MS)	300	17	86	48	69	56
DC-200 (MS)	250	16	57	45	66	43
DC-710 (50% fenil-MS)	225	107	149	153	228	190
EGA (adipato de etilenoglicol)	190	372	577	455	658	619
Esqualano (hidrocarboneto)	150	0	0	0	0	0
FFAP (PEG-ácido nitroterftálico)	250	340	580	397	602	627
Nujol (hidrocarboneto)	100	9	5	2	6	11
OV-1 (MS)	350	16	55	44	65	42
OV-11 (35% fenil-MS)	350	102	142	145	219	178
OV-17 (50% fenil-MS)	350	119	158	162	243	202
OV-25 (75% fenil-MS)	300	178	204	208	305	280
OV-61 (33% fenil-MS)	350	101	143	142	213	174
OV-101 (MS)	350	17	57	45	67	43
OV-202 (50% trifluoropropil (TFP)-MS)	275	146	238	358	468	310
OV-210 (50% TFP-MS)	275	146	238	358	468	310
OV-225 (25% fenil-25% TFP-MS)	250	228	369	338	492	386
OV-275 (dicianoalilsilicone)	250	629	872	763	1106	849
OV-351 (PEG-ácido nitroterftálico)	250	335	552	382	583	540
QF-1 (50% TFP-MS)	250	144	233	355	463	305
SE-30 (MS)	300	15	53	44	64	41
SILAR 10C (cianopropilsilicone)	275	523	757	609	942	801
SP-1000 (PEG-ácido-nitroterftálico)	250	332	555	393	583	546
SP-2100 (MS)	350	17	57	45	67	43
SP-2510 (PEG-modificado)	250	182	622	371	343	316

* x', y', z', u', e s' representam o ΔI para os compostos benzeno, 1-butanol, 2-pentona, 1-nitropropano e piridina, respectivamente.

Como já foi indicado anteriormente, as fases líquidas possuem uma temperatura limite de uso. Muitas vezes, mesmo abaixo desta temperatura limite, ocorre sangria da fase estacionária, principalmente quando da utilização de programação da temperatura. Este inconveniente pode ser contornado com a utilização de fases estacionárias imobilizadas. Neste tipo de material, a fase líquida pode ser ligada quimicamente ao suporte, geralmente sílica, por métodos físicos ou químicos específicos. Reações de entrecruzamento entre as moléculas da fase estacionária também têm sido usadas com o objetivo de torná-las menos voláteis.

As fases imobilizadas são termicamente mais estáveis e podem ser utilizadas em temperaturas de 80 a 90°C superiores as usadas quando as mesmas fases são simplesmente espalhadas sobre o suporte. O filme formado na superfície do suporte é extremamente fino e uniforme resultando em colunas mais eficientes com menores tempos de retenção. Algumas fases são hidroliticamente instáveis, o que limita a escolha do solvente para a amostra.

5. EQUIPAMENTO PARA CROMATOGRAFIA GASOSA

O esquema básico de um cromatógrafo a gás é mostrado na *Figura VIII-4*.

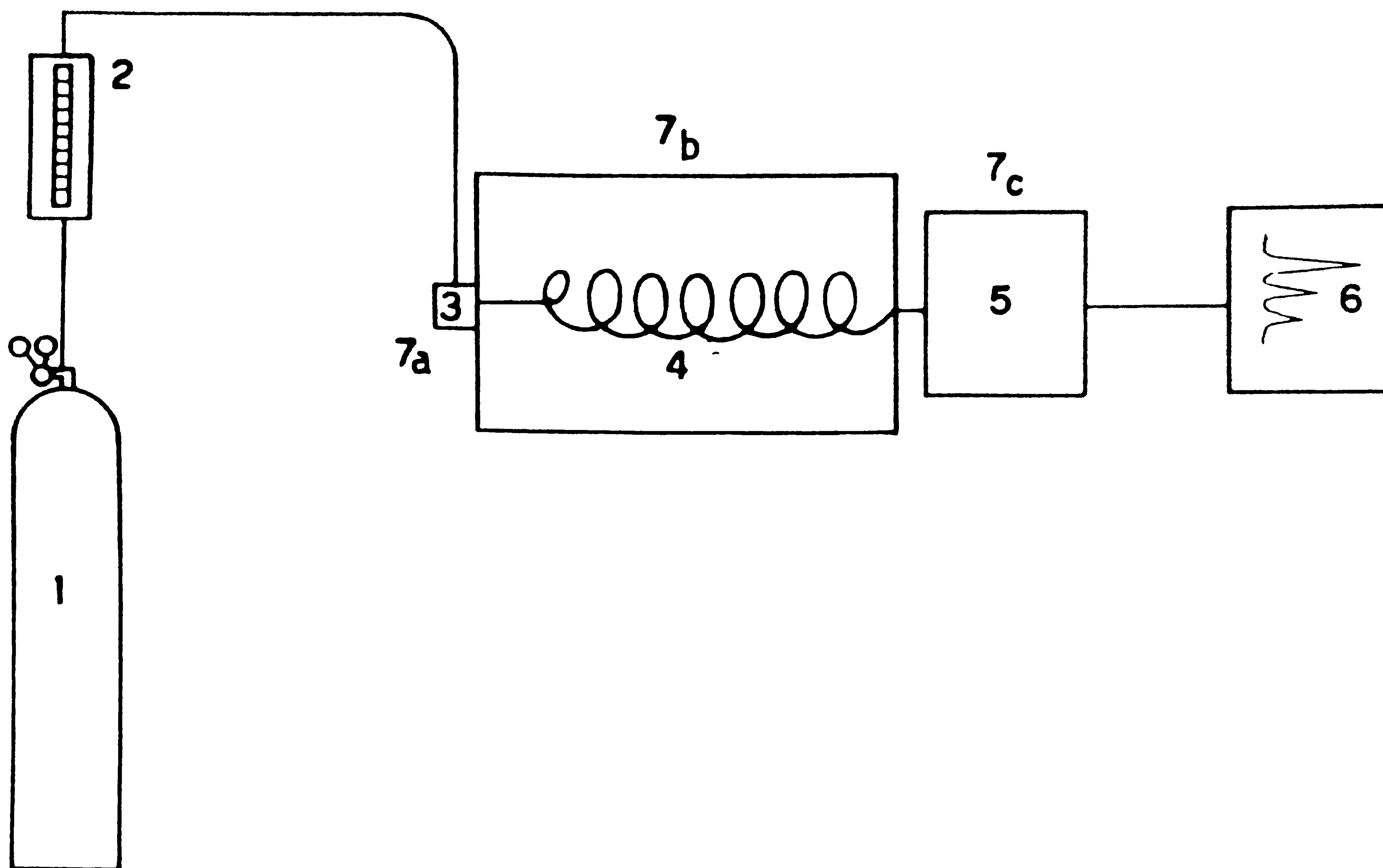



FIGURA VIII-4 Esquema de cromatógrafo a gás.
1: Fonte do gás de arraste
2: Controlador da vazão e regulador de pressão
3: Sistema de injeção da amostra
4: Coluna cromatográfica
5: Sistema de detecção
6: Registrador
7: Termostato para injetor (a), coluna (b) e detector (c).

5.1. Fonte do gás de arraste

A fase móvel, sendo gasosa, torna possível um equilíbrio rápido entre ela e a fase estacionária, fazendo da cromatografia gasosa um sistema altamente eficiente. Um cilindro contendo o gás sob alta pressão serve como fonte do gás de arraste (fase móvel), que levará as substâncias presentes na amostra para fora da coluna, quando elas não estiverem interagindo com a fase estacionária. Os gases mais usados como fases móveis são o nitrogênio, hélio, hidrogênio e argônio. O gás de arraste não deve interagir com o recheio da coluna, deve ser barato, disponível e compatível com o detector usado. Deve também apresentar alta pureza, sendo aconselhável o uso de filtros contendo sílica gel ou peneira molecular, entre o cilindro e o instrumento, para eliminar traços de água e hidrocarbonetos. A eliminação de oxigênio é mais difícil. No entanto, existem filtros especiais com esta finalidade, disponíveis comercialmente. A presença de impurezas no gás de arraste não afeta a separação cromatográfica de maneira significativa, mas sim a estabilidade e resposta dos detectores. A magnitude deste problema aumenta com a maior sensibilidade do detector. Quando se utiliza a programação de temperatura, a pureza do gás de arraste também é crítica; as impurezas podem ficar retidas no topo da coluna e com o aumento da temperatura são eluídas junto com as demais substâncias da amostra.

5.2. Controladores de vazão e de pressão

A vazão do gás de arraste deve ser constante durante a análise, independentemente de variáveis operacionais tais como pressão na entrada da coluna, pressão na saída do detector, temperatura, etc., para que haja reprodutibilidade nos tempos de retenção; a análise quantitativa também é afetada por variações de vazão, devido à mudança nas áreas dos picos.

O controle da vazão é efetuado por controladores de pressão e/ou controladores de fluxo. Os controladores de pressão efetuam uma constrição manual do fluxo de gás para manter constante a pressão na entrada do sistema cromatográfico. O segundo estágio das válvulas do cilindro de gás e válvulas de agulha são exemplos de controladores de pressão. Quando a temperatura da coluna e pressão na saída da mesma ou do detector são mantidas constantes, este tipo de controlador é eficiente. Com a mudança da temperatura durante a análise (programação de temperatura), ou quando se deseja adaptar um sistema na saída da coluna ou detector com a finalidade de coleta do efluente (fins preparativos), a pressão de entrada é mantida constante, mas a vazão é alterada. Nestes casos há necessidade de controladores de fluxo para manter a vazão constante durante toda análise.

5.3. Sistema de injeção da amostra

A injeção da amostra deve ser feita de tal maneira que se obtenha uma banda única e estreita, sendo que falhas na técnica de injeção podem causar assimetria nos picos. A quantidade de amostra injetada não deve ultrapassar a capacidade da coluna, determinada pela quantidade de fase estacionária. Deve também ser reprodutível para tornar possível a análise quantitativa. A eficiência de uma coluna é influenciada pelo volume de amostra injetada; uma diminuição no volume injetado provoca um aumento na eficiência da coluna. Quando os picos são assimétricos o volume da amostra influencia os tempos de retenção. Assim, picos com assimetria frontal terão um maior tempo de retenção à medida em que o volume da amostra injetada aumenta; o inverso ocorre para picos com caudas. O sistema de injeção deve ser aquecido em uma temperatura suficiente para que ocorra a vaporização total da amostra.

A injeção de gases é comumente feita através de uma seringa ou de válvulas. Às vezes, usa-se a injeção de gases em solução. O emprego de válvulas resulta em excelente reprodutibilidade (0,5%). No entanto, há necessidade de balanceamento da pressão e vazão. Estas válvulas são mais facilmente danificadas com o uso prolongado. As seringas utilizadas para a injeção de gases são construídas de modo a evitar vazamentos. A injeção é feita introduzindo-se a agulha através de um septo. Esta técnica de injeção é simples e utiliza o mesmo sistema empregado na injeção de líquidos. A reprodutibilidade na injeção de gases por este sistema é de ± 1%.

A injeção de amostras líquidas pode ser feita usando-se microsseringas e, mais raramente, válvulas. A injeção através de um septo, com o emprego de microsseringas, é bastante reprodutível (± 1%). O septo, construído de silicone e/ou teflon, pode apresentar dois tipos de problemas: vazamentos, devido a injeções repetidas, o que faz com que haja a necessidade de trocas periódicas do mesmo e sangria, causando instabilidades na linha de base e aparecimento de picos fantasmas, quando se utiliza a programação de temperatura.

Sólidos são geralmente dissolvidos em um solvente adequado e analisados sob a forma de solução, porém, também existem dispositivos para a vaporização e injeção diretamente do sólido.

5.4. Coluna cromatográfica

↘ A coluna cromatográfica é um tubo longo, contendo a fase estacionária. Este tubo pode ser de cobre, aço inox, alumínio, vidro, sílica fundida, teflon, etc. Idealmente, o material de construção da coluna não deve interagir com o recheio e nem com as substâncias presentes na amostra.

As colunas podem ser classificadas em recheadas (analíticas e preparativas) e capilares *(Tabela VIII-3 e Figura VIII-5)*.

Tabela VIII-3

Comparação entre colunas recheadas analíticas e colunas capilares

Parâmetro	Recheada analítica	Capilar
Diâmetro interno (mm)	1 - 4	0,15 - 0,75
Comprimento (m)	1 - 3	10 - 100
Pratos teóricos por metro	2400	3000
Espessura do filme líquido (μm)	5	0,5 - 2
Granulometria das partículas (malha)	80 - 100	-
Vazão média (mL/min)	20 - 60	1 - 5
Volume da amostra (μL)	0,2 - 20	0,001 - 0,5

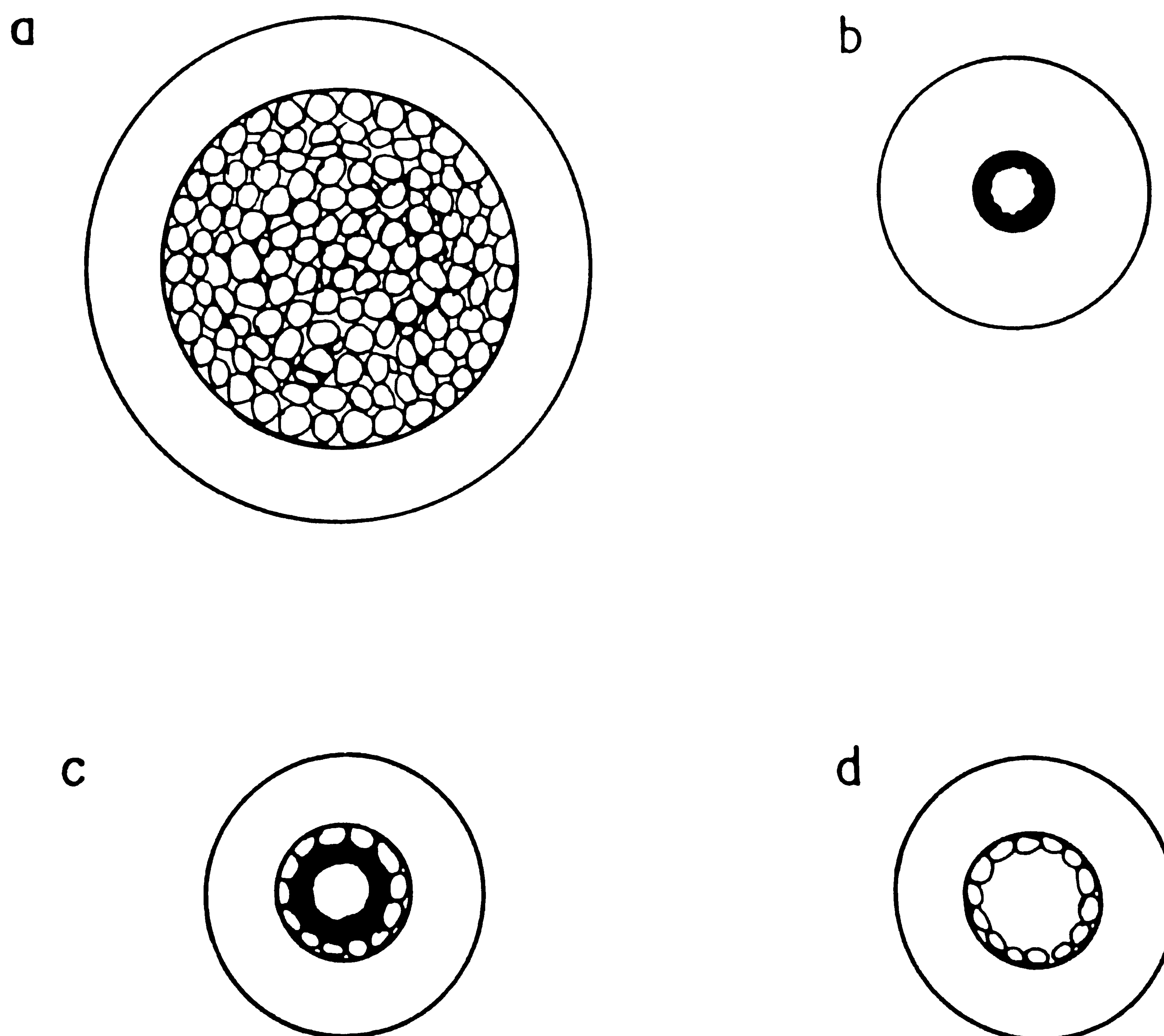



FIGURA VIII-5 Tipos de coluna para cromatografia gasosa. a: coluna recheada analítica; b: coluna capilar com parede recoberta; c: coluna capilar com suporte recoberto; d: coluna capilar com camada porosa.

Atualmente, as colunas recheadas são construídas preferencialmente com aço inox ou vidro. Nas colunas de vidro a amostra pode interagir com grupos silanol,provocando o alargamento dos picos. Isto pode ser evitado, silanizando-se a coluna antes de seu enchimento. Colunas de teflon, ou revestidas com este, são usadas na análise de compostos corrosivos. O formato da coluna varia de acordo com o aparelho. Geralmente são espirais para poder ocupar um menor espaço. O comprimento da coluna, bem como o seu diâmetro interno dependem dos propósitos da análise, em escala analítica ou preparativa.

As colunas recheadas analíticas possuem um diâmetro interno de 1 a 4 mm e comprimento de 1 a 3 m; usualmente, a referência a dimensões é feita em pés (comprimento) e polegadas (diâmetro interno). As colunas preparativas possuem um diâmetro interno maior (5 a 100 mm), possibilitando a injeção de uma maior quantidade de amostra.

As colunas capilares foram introduzidas por GOLAY em 1958. São capilares muito finos, com diâmetros internos de 0,15, 0,32, 0,53 e 0,75 mm e comprimentos de 10 a 100 m. O material de construção destas colunas pode ser níquel, aço inox, vidro ou, preferivelmente, sílica fundida, por ser altamente inerte, pura e produzir colunas flexíveis.

São disponíveis vários tipos de colunas capilares. As colunas capilares com parede recoberta (WCOT) possuem a parede interna do capilar recoberta com um filme da fase estacionária. Nas colunas capilares com suporte recoberto (SCOT), a parede interna do capilar é recoberta com uma camada de um adsorvente (suporte) recoberto com a fase estacionária líquida. Se a parede do capilar for recoberta apenas com uma camada do adsorvente que, neste caso, é a própria fase estacionária, tem-se as colunas capilares com camada porosa (PLOT). Atualmente, têm-se usado fases estacionárias imobilizadas ou quimicamente ligadas às paredes dos tubos (WBOT), permitindo, assim, uma menor volatilização com o aumento da temperatura.

Nas colunas capilares há um aumento significativo no número de pratos teóricos, pois a pressão é muito menor que em colunas recheadas e, conseqüentemente, o comprimento da coluna pode ser muito maior. Outras vantagens no uso de colunas capilares são a eliminação do alargamento de bandas devido a irregularidades no enchimento, bem como análises mais rápidas, mesmo em temperaturas baixas.

As colunas capilares devem apresentar estabilidade física e química. A primeira refere-se à estabilidade do filme depositado sobre as paredes do capilar. Altas velocidades do gás de arraste tendem a deslocar o filme, tornando-o não homogêneo e possibilitando a formação de bolhas. Por outro lado, pode haver perdas da fase estacionária por volatilização. As colunas com fase imobilizada, disponíveis no mercado, fazem com que estes problemas sejam minimizados.

A instabilidade química ocorre quando as fases, em altas temperaturas ou em contato com a superfície ativa dos capilares, sofrem decomposição, formando produtos que são arrastados para fora da coluna, causando uma instabilidade da linha de base. As alterações que ocorrem nas suas estruturas originam mudanças nas suas características de retenção.

Impurezas presentes no gás de arraste também podem levar à decomposição química da fase estacionária. Praticamente, todas as fases estacionárias são afetadas pelo oxigênio, devido ao seu poder oxidante. A água, presente no gás de arraste ou mesmo nas amostras injetadas, pode atuar de maneira indesejável, nas fases imobilizadas, causando hidrólise ou quebra de ligações entre a fase estacionária e a superfície do capilar.

O volume de amostra injetado dependerá do tipo de amostra analisada e das dimensões da coluna *(Tabela VIII-4)*. Em colunas preparativas, pode-se injetar um maior volume que em colunas analíticas. Atualmente, tem-se dado grande ênfase à utilização de colunas capilares, tornando necessário um sistema especial para a injeção de pequenos volumes. Este sistema consta na divisão da amostra injetada, fazendo com que apenas uma pequena porção dela entre na coluna.

Tabela VIII-4

Volumes de amostra para diferentes tipos de coluna

Tipo de coluna	Volume da amostra	
	Gases	Líquidos
Preparativa	0,05 - 1 L	0,02 - 1 mL
Analítica	0,5 - 50 mL	0,2 - 20 μL
Capilar	0,1 - 10 μL	0,001 - 0,5 μL

5.4.1. Preparação de colunas recheadas

Primeiramente, a fase líquida, dissolvida em um solvente conveniente, é misturada ao suporte. O solvente é removido por evaporação sob agitação lenta e contínua, para evitar quebra das partículas e favorecer o recobrimento do suporte de maneira homogênea. Este procedimento é satisfatório para a preparação de recheios com porcentagens de fase líquida variando entre 10 e 30%. Para menores porcentagens de fase líquida é mais conveniente a técnica de filtração. Esta técnica consiste na filtração da suspensão formada pelo suporte, fase estacionária e solvente, e evaporação do solvente remanescente, seguindo os mesmos cuidados citados anteriormente.

Após o recheio estar devidamente pronto, este pode ser introduzido dentro do tubo de vidro ou aço inox de tamanho previamente definido. Os tubos, especialmente os metálicos, necessitam de um processo prolongado de limpeza que envolve a passagem sucessiva de uma série de solventes e soluções: diclorometano, acetona, água, ácido nítrico ou ácido clorídrico concentrados, hidróxido de amônio, N-metilpirrolidona, acetona e, por último, o solvente empregado no preparo do recheio. Tubos de vidro são silanizados, após o processo de limpeza, para recobrimento dos sítios ativos remanescentes.

O enchimento da coluna é feito com o auxílio de uma bomba de vácuo ligada a uma das extremidades do tubo, na qual foi colocado um tampão de lã de vidro. Durante o enchimento da coluna pode-se usar um vibrador para que este seja mais homogêneo. Após a coluna ter sido completamente recheada, coloca-se um outro tampão de lã de vidro na outra extremidade do tubo.

Antes da utilização da coluna, há necessidade de uma etapa de condicionamento para retirar o restante do solvente utilizado no preparo da fase estacionária e outras impurezas voláteis. A coluna é colocada no cromatógrafo com a saída para o detector desligada do mesmo; com o gás de arraste passando pela coluna, a sua temperatura é aumentada lentamente, até uma temperatura 20°C acima da temperatura máxima em que a coluna deverá ser utilizada. Esta temperatura não deve exceder à temperatura limite de uso da fase estacionária. O tempo de condicionamento depende da natureza da fase estacionária, variando entre horas e até dias.

5.4.2. Preparação de colunas capilares

A preparação de colunas capilares é mais complexa devido a dificuldades em se obter um filme uniforme sobre toda superfície interna do capilar. O leitor interessado poderá encontrar detalhes nos livros textos citados no final deste capítulo.

5.5. Sistema de detecção

As substâncias presentes na amostra passam através da coluna, onde são separadas, e chegam ao sistema de detecção. A seguir serão indicadas algumas características importantes dos detectores. Na prática, nem todas estas características podem ser atendidas; então, escolhe-se o detector que melhor se adapta ao tipo de análise a ser realizada.

a. Seletividade - Os detectores podem responder a todas as substâncias, geralmente medindo a variação da composição do gás de arraste que sai da coluna, e, neste caso, são ditos de resposta universal. Detectores seletivos respondem a apenas uma classe de substâncias e são mais sensíveis que os universais. Além desses dois tipos de detectores, existem também os específicos, que respondem a um (ou a poucos) elemento(s), independente das substâncias que os contêm.

b. A sensibilidade é definida como a mudança na resposta do detector em função da quantidade detectada. Os detectores são classificados em duas categorias, de acordo com seu princípio de operação. Os detectores cuja resposta é independente da vazão da fase móvel são ditos sensíveis à velocidade de fluxo de massa. Nestes detectores a sensibilidade é definida como a razão da área do pico pela massa injetada. Nos detectores sensíveis à concentração, a resposta varia em função da vazão da fase móvel. Neste caso, a sensibilidade é definida como o produto da área do pico pela vazão da fase móvel dividido pela massa da amostra. A medida da sensibilidade é utilizada como termo de comparação entre detectores da mesma categoria. Para este tipo de comparação são empregados a mesma coluna, amostra, e, obviamente, os mesmos valores no eletrômetro/amplificador e atenuação.

c. Ruído - São deflexões da linha de base num certo período de tempo, representando efeitos eletrônicos do sistema de detecção. Este ruído pode ser estático, quando representa a instabilidade do detector isolado do cromatógrafo, e/ou dinâmico, observado em condições normais de operação. Idealmente, os dois valores devem ser próximos.

d. Quantidade mínima detectável - Alguns detectores conseguem detectar quantidades de uma substância na faixa de picogramas (10^{-12} g) ou menos, enquanto que outros detectam apenas 10^{-8}g. O nível de ruído do detector determina esta quantidade mínima detectável, definida como a quantidade de amostra que gera uma resposta duas vezes maior que o nível de ruído. A quantidade mínima detectável é dependente de parâmetros relacionados com a coluna e pode ser usada para comparar detectores quanto a sua resposta quantitativa.

e. Faixa linear - Uma análise quantitativa depende da relação entre a concentração e resposta do detector, ou seja, intensidade do sinal gerado para uma determinada quantidade de amostra. Faixa linear é definida como a razão entre a maior e menor concentração da amostra, onde a resposta do detector é linear (desvio de 5%). O detector deve responder de maneira linear a uma grande faixa de concentração da substância presente na amostra.

f. Outras características - Os detectores devem ser, quando possível, insensíveis a alterações de vazão e de temperatura e também devem ser resistentes às condições de trabalho.

Os detectores podem ser classificados em integrais ou diferenciais *(Figura VIII-6)*. Os detectores integrais, também chamados de cumulativos, respondem à massa total da substância em uma zona eluída. Quando o gás de arraste passa pelo detector, gera uma linha de base; uma substância da amostra ao ser eluída gera uma subida da linha de base, cuja altura é proporcional a sua concentração (D na *Figura VIII-6a)*; a eluição de uma nova substância gera uma nova subida da linha de base. Os detectores diferenciais ou

instantâneos são mais usados em cromatografia gasosa; respondem de maneira proporcional à concentração ou ao fluxo de massa da substância eluída, gerando picos, cuja área ou intensidade do sinal elétrico é proporcional à concentração ou ao fluxo de massa.

RESPOSTA DO DETECTOR

a

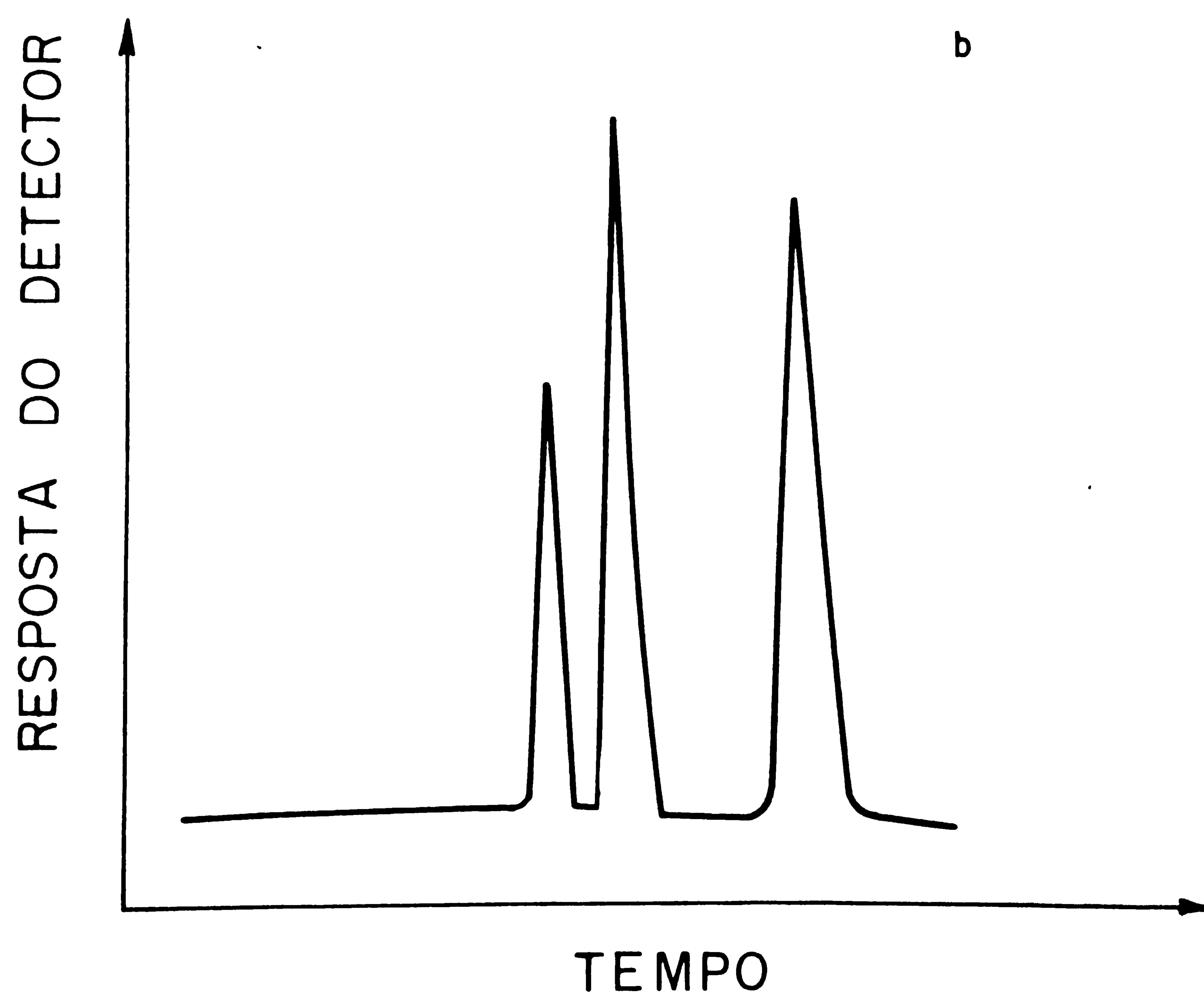
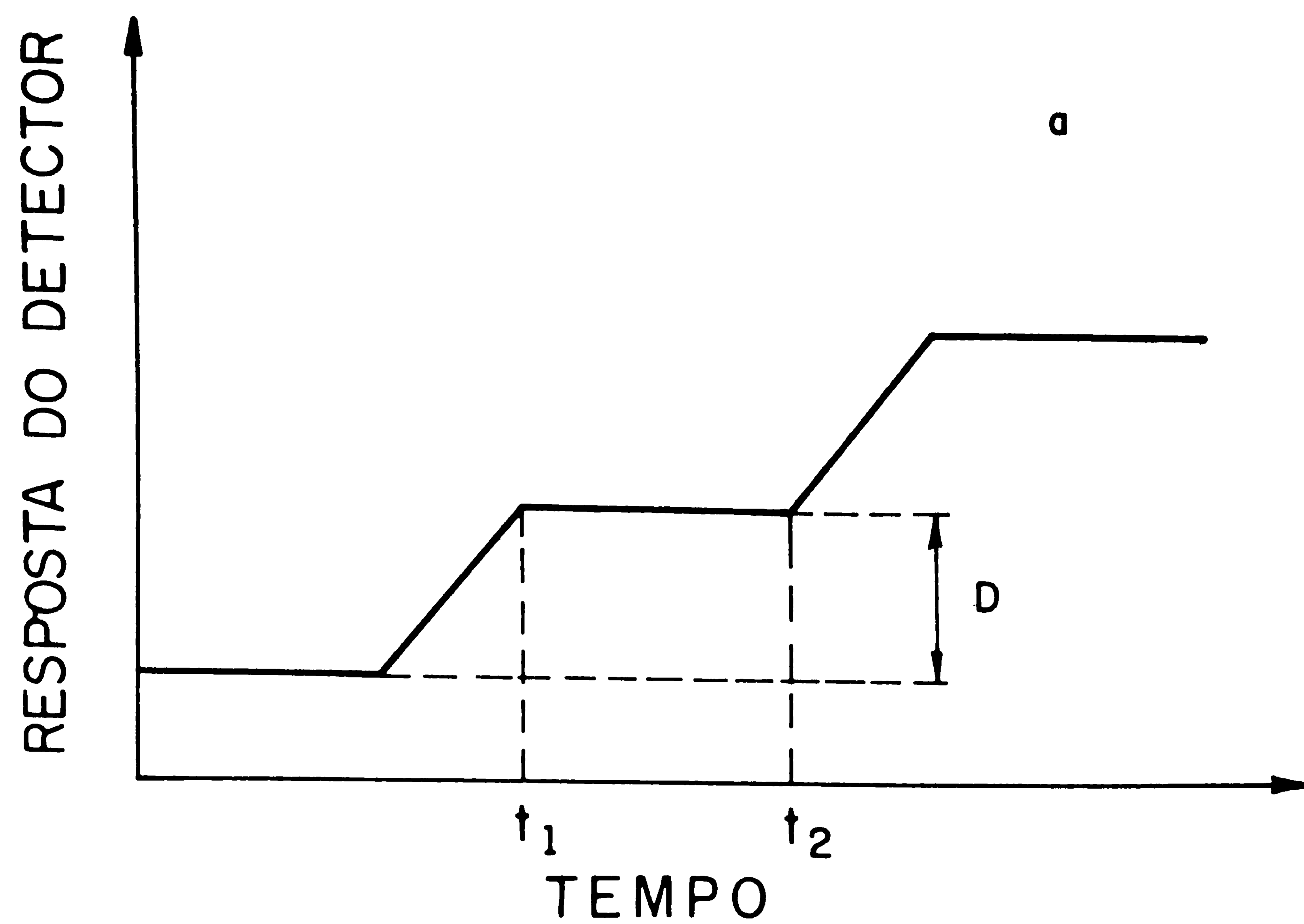
D

t_1 t_2

TEMPO

RESPOSTA DO DETECTOR

b

TEMPO

A seguir serão discutidos alguns dos detectores mais usados em cromatografia gasosa.

5.5.1. Detector por condutividade térmica

São detectores de resposta universal, sensíveis à concentração. Seu funcionamento baseia-se no princípio de que um corpo quente perde calor a uma velocidade que depende da composição dos gases que o circundam. Assim, a velocidade de perda do calor pode ser usada como uma medida da composição do gás. A *Figura VIII-7* mostra um esquema do detector por condutividade térmica.

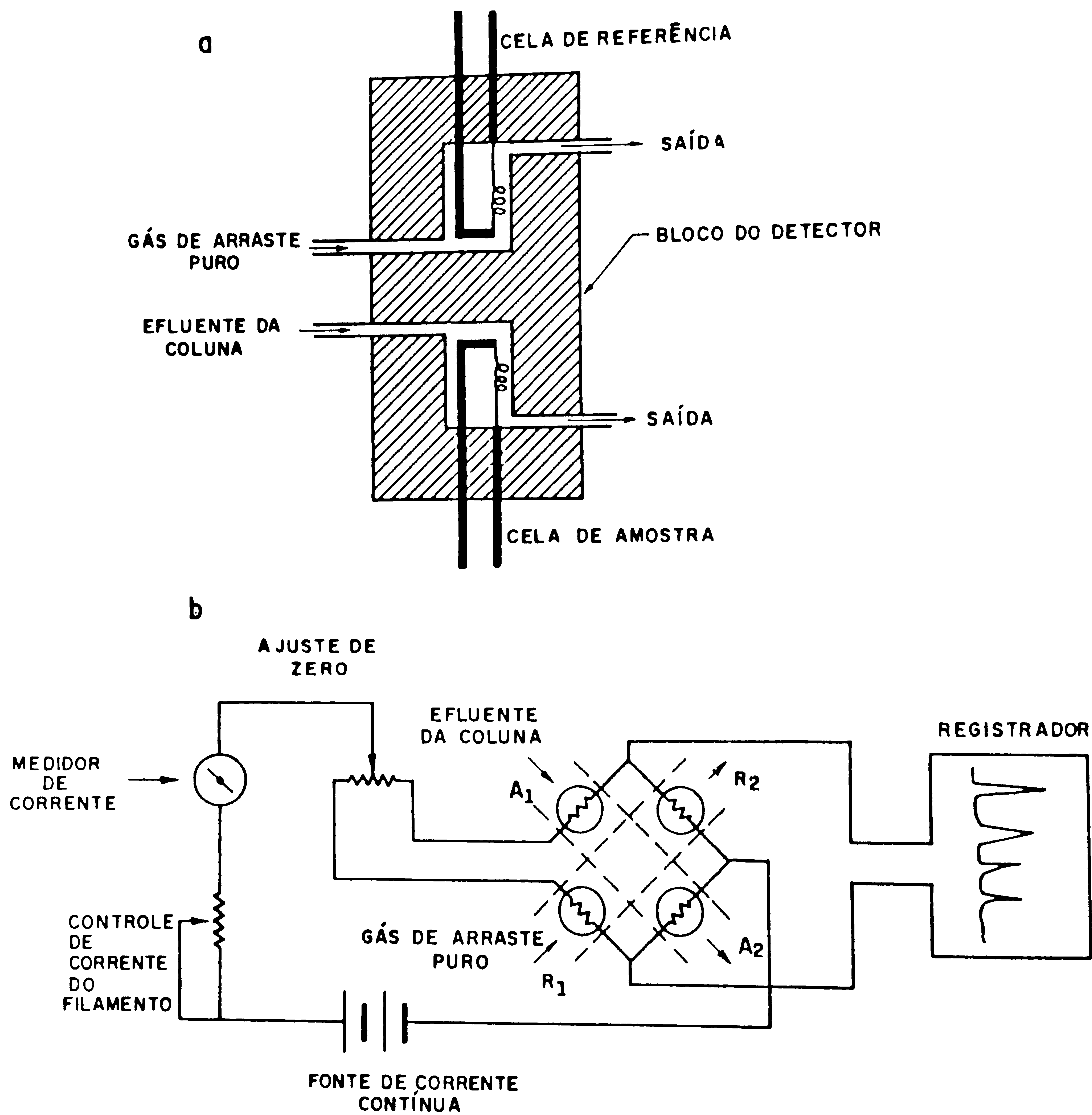



FIGURA VIII-6 Cromatogramas típicos obtidos com detectores integrais (a) e diferenciais (b).

FIGURA VIII-7 Esquema de um detector por condutividade térmica.
a. corte do bloco do detector
b. ponte de Wheatstone

Neste detector, o corpo quente é um conjunto de filamentos de metal (platina, tungstênio, níquel) dentro de um bloco metálico. A linha de gases é montada de forma que somente o gás de arraste passe por uma das celas contendo os filamentos, enquanto que o efluente da coluna passa pela outra. Os filamentos aquecidos, ligados formando uma ponte de Wheatstone, perdem calor de maneira constante quando somente o gás de arraste passa pelas duas celas. Essa perda de calor gera um sinal constante que é registrado na forma de linha de base. Quando há moléculas da amostra saindo da coluna junto com o gás de arraste, ocorre a perda de calor pelo filamento nesta cela, em uma velocidade menor, gerando um sinal.

O gás de arraste usado com este detector deve ter uma condutividade térmica elevada, isto é, massa molecular pequena. Pela *Tabela VIII-5* pode-se concluir que o hidrogênio e hélio são os melhores gases para serem usados com este tipo de detector. A amostra é constituída, geralmente, de moléculas com uma massa molecular elevada, provocando, portanto, uma diminuição na condutividade térmica do gás que circunda o filamento aquecido. A perda de calor pelo filamento em uma velocidade menor é medida para gerar um sinal.

Tabela VIII-5

Característica de alguns gases usados como fase móvel em cromatografia gasosa.

Gás	Condutividade térmica a 100°C $mJs^{-1}m^{-1}K^{-1}$	Viscosidade a 100°C $\mu Pa.s$
Argônio	20,9	27,0
Dióxido de carbono	20,5	18,9
Hélio	162	22,8
Hidrogênio	205	10,3
Nitrogênio	30,5	20,8

Este detector não destrói a amostra que elui da coluna, possibilitando a sua recuperação na mesma forma química em que foi injetada, sendo útil para fins preparativos.

As melhores condições de operação deste detector podem ser conseguidas usando-se um gás com alta condutividade térmica, aumentando-se a temperatura do filamento, diminuindo-se a temperatura do bloco e reduzindo-se a vazão do gás de arraste.

5.5.2. Detector por ionização em chama

Este detector é bastante popular devido a alta sensibilidade e resposta quase universal, apesar de responder a propriedades do soluto; é sensível ao fluxo de massa passando por ele em um determinado tempo. O gás de arraste chega ao detector e uma chama produzida pela combustão de ar e hidrogênio queima e ioniza algumas das moléculas presentes nesta corrente gasosa (impurezas presentes no gás de arraste, produtos originados das sangrias da coluna e septo). Quando moléculas da amostra presentes no gás de arraste chegam ao detector, elas são queimadas na chama, ocorrendo a formação de íons, que são coletados por um eletrodo. A quantidade de íons formados quando a amostra está presente no gás eluente é muito maior que a quantidade formada quando somente o gás de arraste está sendo queimado. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada e captada pelo registrador *(Figura VIII-8)*.

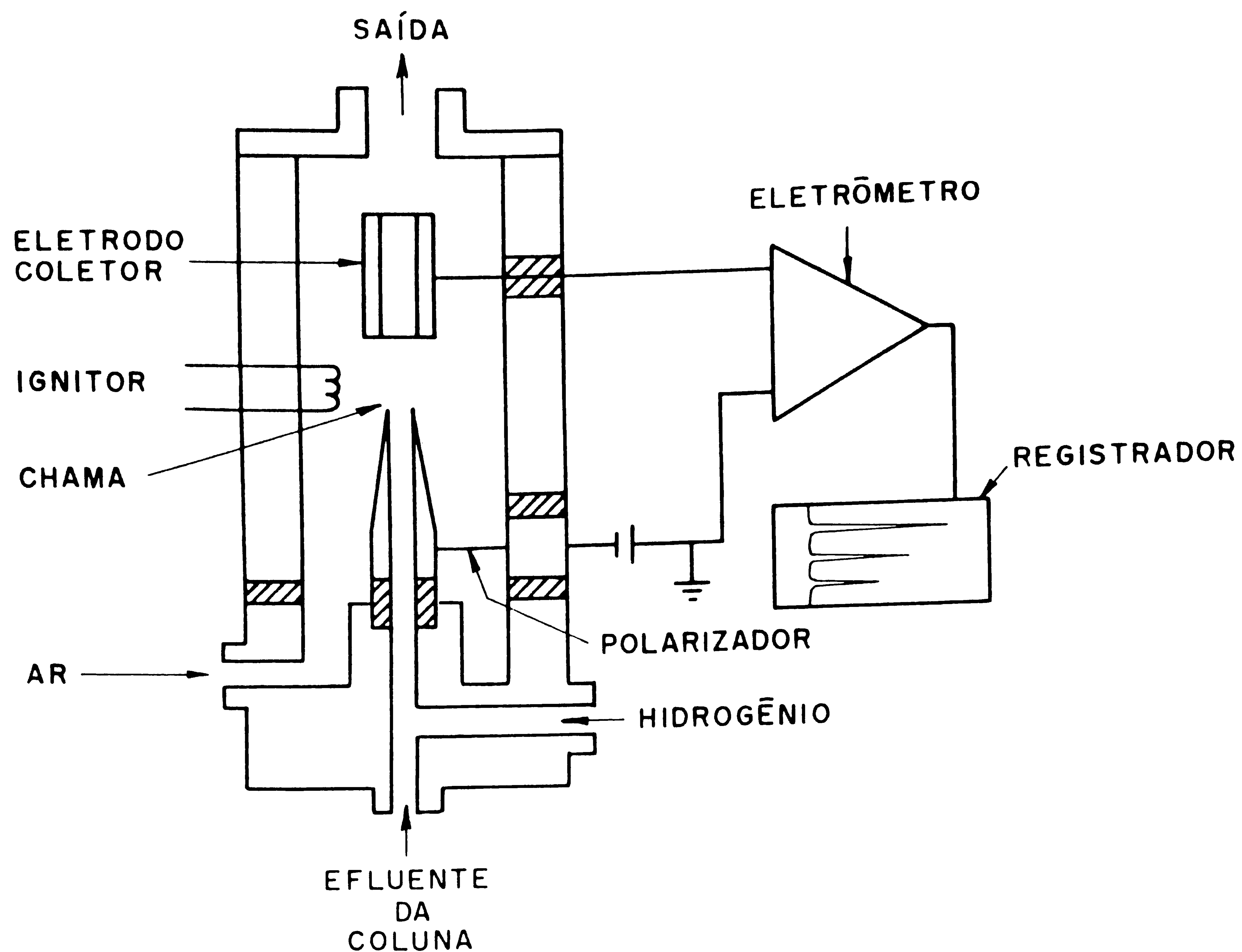



FIGURA VIII-8 Esquema de um detector por ionização em chama.

Este detector responde satisfatoriamente a quase todos os compostos, com exceção de: He, Ar, Kr, Xe, O_2, N_2, H_2S, NO, SO_2, N_2O, NO_2, CO, CO_2, COS, $SiCl_4$, $SiHCl_3$ e SiF_4. É pouco sensível a CS_2 e a água, que, portanto, podem ser utilizados como solventes para as amostras injetadas.

A magnitude do sinal é proporcional ao número de átomos de carbono (e hidrogênio) na molécula, sendo diminuída pelo processo de captura de elétrons, envolvendo grupos eletronegativos formados na combustão.

A eficiência do detector depende, também, da razão das vazões dos gases que alimentam a chama. Em geral, boa sensibilidade e estabilidade são obtidas usando a proporção de 1 : 1 : 10 para o gás de arraste, hidrogênio e ar comprimido, respectivamente.

Este detector é bastante usado em bioquímica, como, por exemplo, na análise de esteróides. A presença de oxigênio ou enxofre nas moléculas diminui a resposta, mas, mesmo assim, pode ser usado na análise de compostos como ácidos orgânicos e ésteres de ácidos graxos e dicarboxílicos.

5.5.3. Detector por captura de elétrons

Este detector é seletivo, respondendo muito bem a halogenetos orgânicos, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. É praticamente insensível a hidrocarbonetos, álcoois e cetonas. A

sensibilidade seletiva a haletos faz com este detector seja particularmente útil na análise de pesticidas clorados.

Quando o gás de arraste (N_2) passa pelo detector, é ionizado por partículas beta emitidas por fontes de ^3H ou ^{63}Ni. Os elétrons produzidos neste processo são coletados em um ânodo, gerando uma corrente que é amplificada por um eletrômetro, resultando a linha de base. Moléculas eluindo da coluna, capazes de capturar elétrons, diminuem esta corrente, gerando um sinal proporcional a sua concentração *(Figura VIII-9)*.

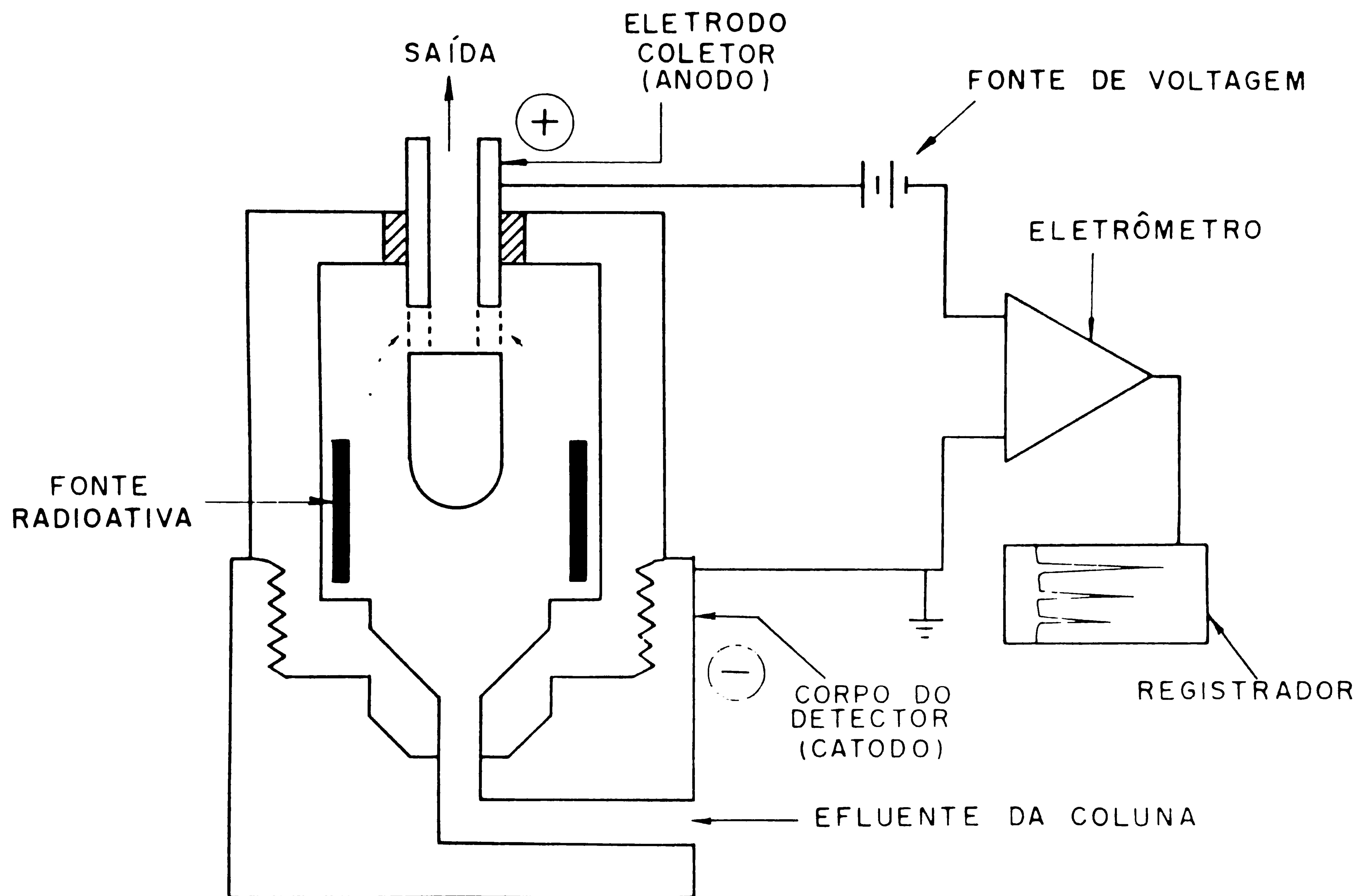



FIGURA VIII-9 Esquema de um detector por captura de elétrons.

Fontes de ^3H fornecem maiores faixas lineares, no entanto, a sua temperatura máxima de uso é de cerca de 220°C, o que em certos casos pode levar à contaminação do detector, quando da análise de compostos de massa molecular elevada, ou mesmo devido à sangria da coluna. As fontes de ^{63}Ni podem ser aquecidas a maiores temperaturas (350°C), no entanto, apresentam uma menor faixa linear. Esta faixa linear reduzida é a grande desvantagem do detector por captura de elétrons, o que, em certos casos, é bastante inconveniente.

O detector por captura de elétrons, geralmente, emprega nitrogênio com alto grau de pureza como fase móvel. Traços de água ou oxigênio afetam a sua sensibilidade e linearidade.

5.5.4. Detector termiônico

Os detectores termiônicos são detectores por ionização, onde utilizam-se sais de metais alcalinos em um plasma gerado pela aplicação de um potencial elétrico adequado em um fluxo de ar e hidrogênio.

Nestes detectores existe uma pérola de um sal de metal alcalino (brometo de césio ou sulfato de rubídio), eletricamente aquecida e colocada entre o queimador e o eletrodo coletor. A fonte é mantida em um potencial negativo para evitar a perda dos íons do metal alcalino, e para anular a resposta do detector no modo de ionização de chama. Na região da pérola existe a chama ou um plasma suportados pelo fluxo de ar e hidrogênio. A ação catalítica do metal alcalino em compostos contendo nitrogênio ou fósforo forma íons com carga negativa, que são coletados no ânodo (eletrodo coletor) para produzir uma corrente. A *Figura VIII-10* mostra um esquema do detector termiônico.

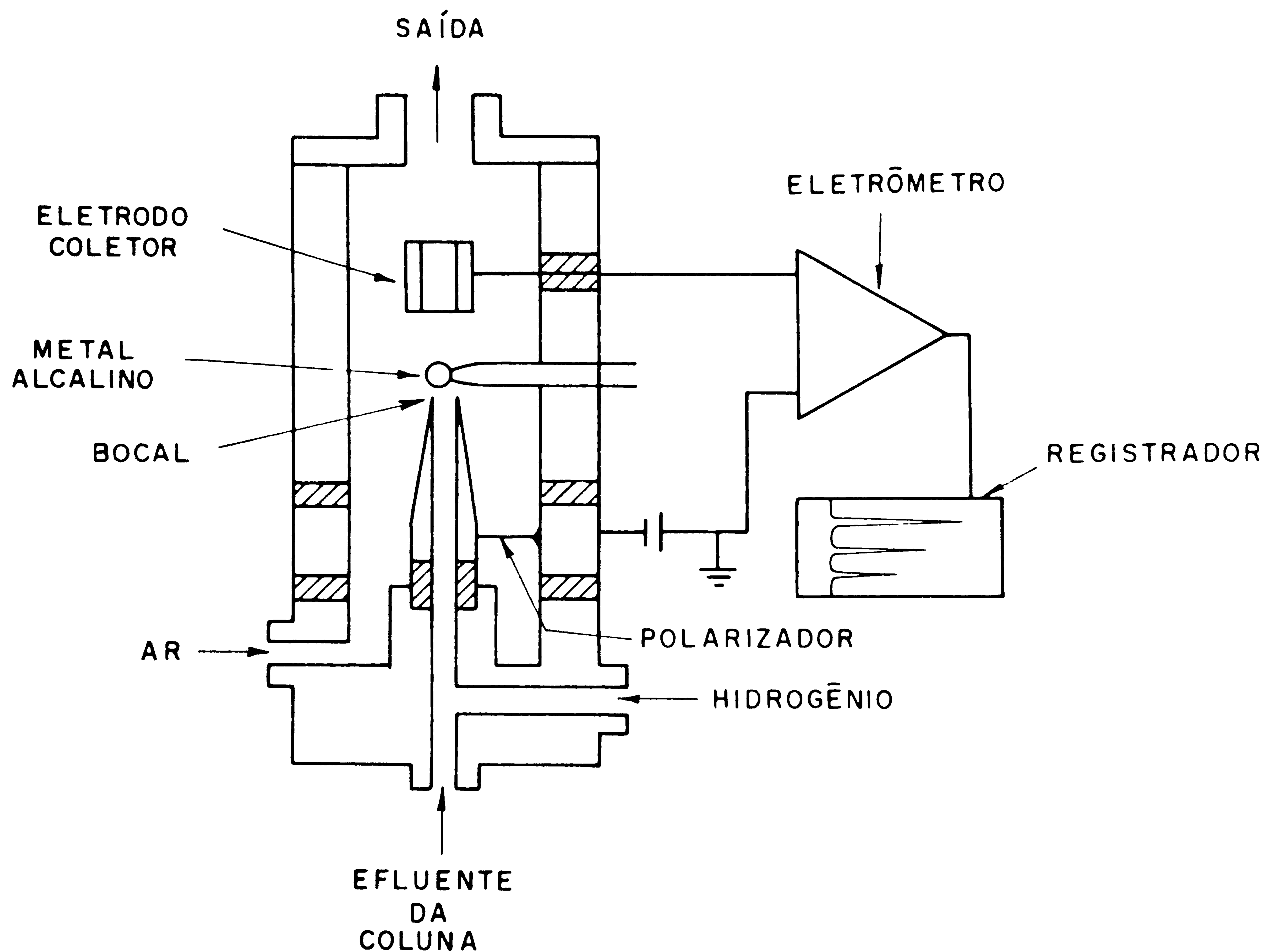



FIGURA VIII-10 Esquema de um detector termiônico.

A seletividade e sensibilidade são dependentes de variáveis experimentais, principalmente, corrente de aquecimento da pérola, potencial do queimador, escolha do gás de arraste, vazão de ar e hidrogênio e posição da pérola.

O detector termiônico é bastante utilizado em análises ambientais e biomédicas para a determinação de pesticidas e drogas.

A *Tabela VIII-6* resume algumas propriedades dos detectores acima relacionados.

Tabela VIII-6

Algumas características de detectores comumente usados em cromatografia gasosa.

Característica	Condutividade Térmica	Ionização em Chama	Captura de Elétrons	Termiônico
Princípio de operação	Condutividade do gás	Chama de $H_2 + O_2$ (2000°C)	Perda de corrente por captura de elétrons	Plasma de $H_2 + O_2$ na presença de metal alcalino
Tempo de resposta	100 - 150 ms	1 ms	1 - 5 s	---
Temp máx. de operação	450°C	400°C	225°C (^3H) 400°C (^{63}Ni)	300°C
Gás de arraste	He, H_2, N_2, Ar,	He, N_2	N_2, Ar + 10% CH_4	N_2-fosforados He-nitrogenados
Sensibilidade (g/s)	6×10^{-10}	9×10^{-13} (alcanos)	10^{-14} (CCl_4)	10^{-14}-fosforados 10^{-13}-nitrogenados
Quant. mínima detectável (g)	10^{-8} (CH_4)	2×10^{-12} (alcanos)	2×10^{-14} (^3H) 4×10^{-12} (^{63}Ni)	2×10^{-12}(paration) 2×10^{-10}(azobenzeno)
Estabilidade	boa	excelente	regular	regular
Faixa de linearidade	10^4	10^8	1000 (^3H) 100 (^{63}Ni)	10^4
Seletividade	universal	compostos orgânicos	compostos com halogênios, nitratos, etc.	compostos contendo P ou N
Tipo	não destrutivo	destrutivo	não destrutivo	destrutivo
Aplicação (ex.)	geral	compostos orgânicos	pesticidas clorados	pesticidas fosforados e nitrogenados

5.6. Registrador

O sinal gerado pelo detector, quando a amostra passa por ele após eluir da coluna, é registrado graficamente. Os registradores usados em cromatografia gasosa são do tipo potenciométrico e operam na escala de 1 mV, com um tempo de resposta de um segundo ou menos.

Os sinais podem também ser processados em integradores ou microcomputadores acoplados ao detector que, além de apresentarem os cromatogramas, registram os tempos de retenção e as áreas de cada pico. Os microcomputadores apropriadamente programados podem fornecer outros dados calculados a partir do cromatograma.

5.7. Termostato

Durante uma análise, as temperaturas do injetor, coluna e detector necessitam ser controladas. O injetor deve ser aquecido a uma temperatura alta para que haja vaporização total da amostra, porém, suficientemente baixa para que não haja decomposição térmica da amostra injetada. O sistema de aquecimento da coluna deve manter a sua temperatura constante durante a análise, no caso de cromatografia gasosa isotérmica, ou fornecer uma variação da temperatura, de maneira reprodutível no caso de

programações. O controle de temperatura da coluna deve ser rigoroso e reprodutível para que não haja alterações nos tempos de retenção durante as análises. A temperatura de uso de uma coluna é limitada pela fase estacionária usada, como foi visto na secção 4.2, deste capítulo. A influência da temperatura no detector depende do detector usado. Basicamente, a temperatura deve ser suficientemente alta, para que não haja condensação da amostra eluída da coluna, mas dentro dos limites especificados para cada detector.

6. ANÁLISE QUALITATIVA

A cromatografia gasosa é uma técnica que permite a separação das substâncias presentes na amostra, podendo ser usada também para sua identificação.

A identificação pode ser feita comparando-se o tempo ou volume de retenção de um padrão com o da amostra. Se um composto conhecido possui o mesmo tempo de retenção que um dado composto na amostra, pode tratar-se da mesma substância. Isto não é conclusivo, porque dois compostos podem ter o mesmo tempo de retenção em determinadas condições de análise. O tempo de retenção pode ser corrigido para eliminar a influência do tempo em que a substância fica na fase móvel, então compara-se o tempo de retenção ajustado (t'_R).

O melhor método, usando dados de retenção, compara o tempo de retenção ajustado da amostra em relação a um padrão, com o tempo de retenção de um composto conhecido relacionado com este mesmo padrão. Este método, chamado retenção relativa, é de fácil obtenção e depende apenas da temperatura da coluna e tipo de fase estacionária usada.

A identificação também pode ser feita relacionando-se o logaritmo de um dado de retenção (por exemplo, t'_R) com uma propriedade da amostra (temperatura de ebulição, número de átomos de carbono, massa molecular, etc.). Em análises usando programação de temperatura, relacionam-se estas propriedades com o parâmetro de retenção (não se usa a escala logarítmica). Este método é empregado quando se deseja identificar um membro de uma série homóloga.

O índice de retenção definido por KOVATS, além de ser usado para a comparação entre fases estacionárias, também pode ser usado para a identificação. O índice de retenção tem a vantagem de variar muito pouco, ou de maneira linear, com a temperatura (pelo menos em colunas pouco polares).

Se estes dados de retenção forem obtidos empregando-se duas ou mais colunas e/ou detectores diferentes, haverá, evidentemente, uma maior certeza nos resultados.

Quando a quantidade de amostra injetada é suficientemente grande, é possível coletar a amostra na saída do detector ou na saída da coluna, quando o detector destrói a amostra. Os compostos são coletados resfriando-se um tubo onde passa o gás eluente com um banho de gelo seco ou nitrogênio líquido, e depois identificados, usando-se técnicas auxiliares como espectrofotometria no infravermelho (IV), visível e ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massas (EM).

O uso de um espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo a gás (CG-EM) permite a identificação positiva de quase todos os compostos (exceto isômeros), a nível de microgramas, mas o equipamento possui um preço bastante elevado, o que limita sua aplicação.

Basicamente, o CG-EM consta de um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação dos mesmos e um sistema para a detecção dos íons e interpretação dos dados obtidos.

A maior dificuldade encontrada no acoplamento do cromatógrafo a gás com o espectrômetro de massas é a redução da pressão na saída da coluna para valores menores a 10^{-3} Pa (10^{-8} Bar) na câmara de ionização. Em colunas recheadas, onde a vazão da fase móvel é tipicamente de 20 - 50 mL/min, este acoplamento é muito difícil, mas o uso de colunas capilares com vazões de 1 a 5 mL/min permite este interfaceamento. Com um acoplamento perfeito deve-se ter a mesma resolução obtida, empregando-se detectores convencionais e nenhum composto deve ter sua natureza química alterada até o momento de entrar na câmara de ionização. A conexão pode ser feita obedecendo-se a estes parâmetros, através de separadores moleculares, conexão direta e com divisores abertos.

Os separadores moleculares são mais utilizados quando se empregam colunas recheadas, onde a vazão da fase móvel é excessivamente alta. São sistemas que separam, tanto quanto possível, as moléculas do gás de arraste das moléculas da amostra. Exemplos deste tipo de separador são mostrados na *Figura VIII-11.* O efluente da coluna passa por um orifício em alinhamento perfeito com outro; entre estes dois orifícios as moléculas do gás de arraste se difundem mais rapidamente para fora do feixe, devido a sua menor massa molecular, enquanto que as moléculas da amostra, de forma mais concentrada, entram na câmara de ionização através do segundo orifício.

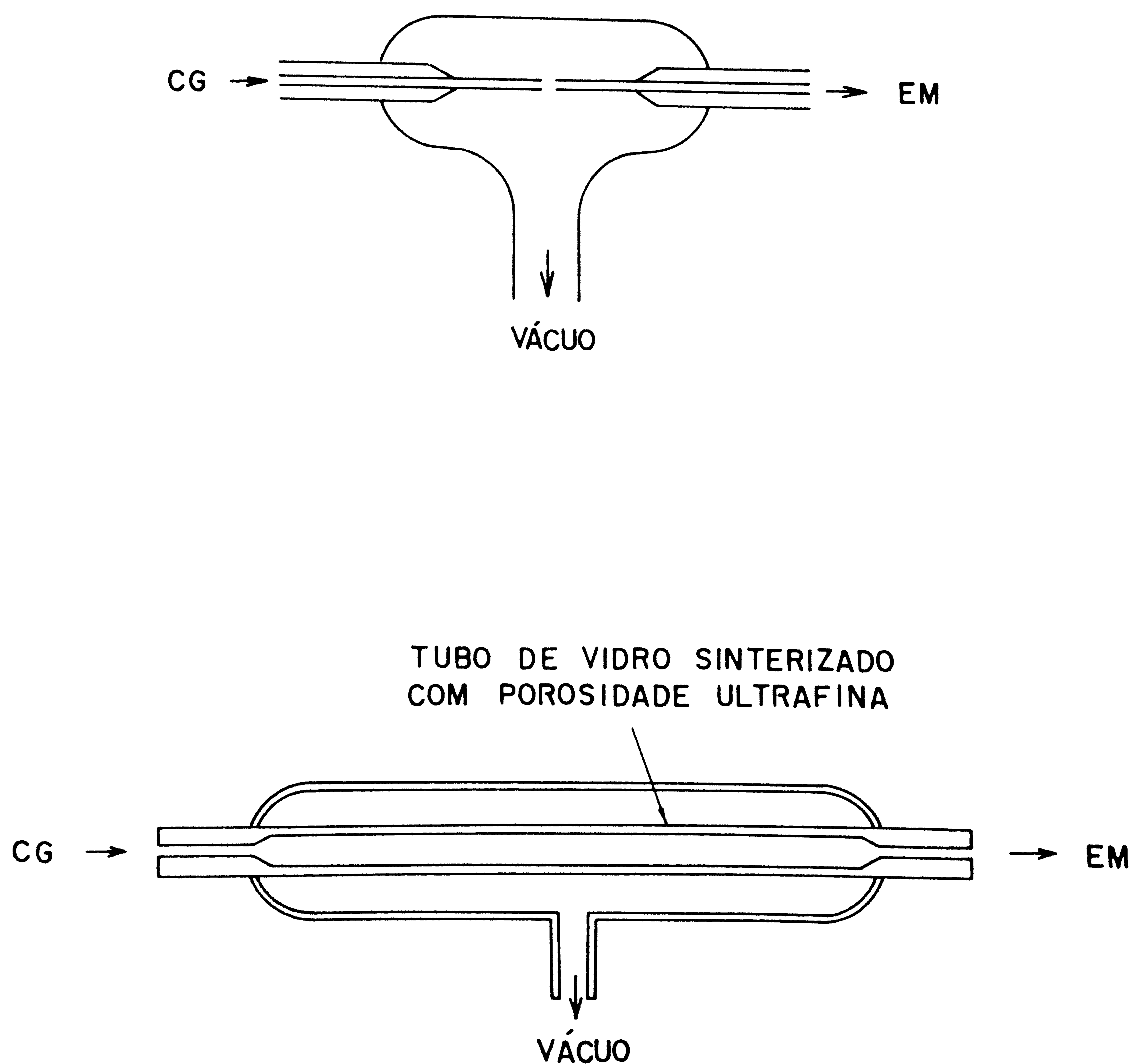



FIGURA VIII-11 Separadores moleculares usados na interface entre um cromatógrafo a gás e um espectrômetro de massas.

Quando a vazão da fase móvel é suficientemente baixa (1-5 mL/min), como quando se usa colunas capilares, o acoplamento de colunas ao espectrômetro de massas pode ser feito diretamente. Atualmente, existem bombas de alto vácuo na câmara de ionização, o que faz com que a vazão da fase móvel não seja um fator tão limitante para o acoplamento direto. É importante lembrar que ocorrem mudanças na retenção da amostra, pois a pressão na saída da coluna, neste caso, não é a mesma de quando se utiliza outro tipo de detector.

No acoplamento através de divisor aberto existe uma separação entre o final da coluna e a entrada do espectrômetro de massas. Esta região é purgada com hélio, que arrasta parte da fase móvel, fazendo com que haja uma concentração da amostra. Este sistema possui inúmeras vantagens, entre as quais é importante citar: não existe alargamento dos picos nesta região e o final da coluna está sob pressão atmosférica, não havendo mudanças na retenção das substâncias presentes na amostra.

A ionização das moléculas da amostra acontece na câmara de ionização e é feita principalmente por impacto eletrônico ou ionização química. A câmara de ionização é aquecida para evitar a condensação da amostra e mantida sob vácuo para que os íons formados não colidam com outras moléculas neutras que não foram ionizadas.

No método do impacto eletrônico, um fluxo de elétrons com energia de ionização específica é produzido por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido. Estes elétrons com energia de, geralmente, 70 eV colidem com as moléculas da amostra provocando a ionização, bem como a fragmentação das mesmas. Às vezes, o íon molecular formado é instável sob as condições de impacto eletrônico e, neste caso, emprega-se a ionização química.

A ionização química é produzida por reações íon-molécula, entre a molécula neutra da amostra e íons provenientes de reagentes presentes na câmara de ionização. Na verdade, estes reagentes como por exemplo, metano, formam íons devido ao impacto eletrônico e estes íons formados colidem com a amostra. Para favorecer este tipo de mecanismo a concentração do reagente é suficientemente maior que a da amostra,de tal modo que praticamente somente as moléculas do reagente são ionizadas por impacto eletrônico. Neste caso, a pressão na câmara de ionização é maior para favorecer a reação íon-molécula.

Quando formados, os íons deixam a câmara de ionização e entram em um outro compartimento, onde são separados de acordo com a razão massa/carga, através da imposição de um campo elétrico ou magnético externo.

Depois de separados, os íons são detectados e um sistema sofisticado processa os dados obtidos, fornecendo informações qualitativas e quantitativas.

7. ANÁLISE QUANTITATIVA

Em uma análise quantitativa deve-se tomar cuidado em todas as etapas, para evitar erros. A amostra a ser analisada deve ser representativa do total; não deve haver perdas e nem contaminações durante seu preparo. A etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo também pode ser fonte de erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte; resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão; quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector; etc.

Após a obtenção do cromatograma, faz-se a integração dos sinais, que tem por finalidade transformar a intensidade do sinal emitido pelo detector em uma medida relacionada com a quantidade da substância analisada na amostra. A integração dos sinais pode ser feita usando-se os seguintes métodos:

a. Altura do pico - Este método não é muito usado porque sofre muita influência de variações instrumentais; não deve ser usado quando os picos são assimétricos ou muito largos. Traça- se uma perpendicular à linha de base passando pela inflexão máxima do pico; a medida desde a linha de base até este ponto de inflexão máxima corresponde a altura do pico *(Figura VIII-12a).*

b. Área do pico - Pode-se calcular a área do pico traçando-se tangentes nos dois lados do pico *(Figura VIII-12b)*; a intersecção destas duas tangentes com a linha de base fornece um triângulo cuja área pode ser calculada pela fórmula:

$$A = \frac{a \times w_b}{2}$$

onde : A = área do pico

a = altura do pico, medido como no item a

w_b = largura do pico na linha de base

A área também pode ser calculada usando-se a largura na meia altura, isto é, formando um triângulo na metade superior do pico *(Figura VIII-12c)*. Neste caso, a área é calculada:

$$A = a \times w_h$$

onde w_h é a largura do pico na meia altura.

c. Outros tipos de integração - A integração também pode ser feita pesando-se o pedaço de papel delimitado pelo pico, que é o método manual de preferência para picos altamente assimétricos.

Recentemente têm-se usado integradores eletromecânicos ou eletrônicos.

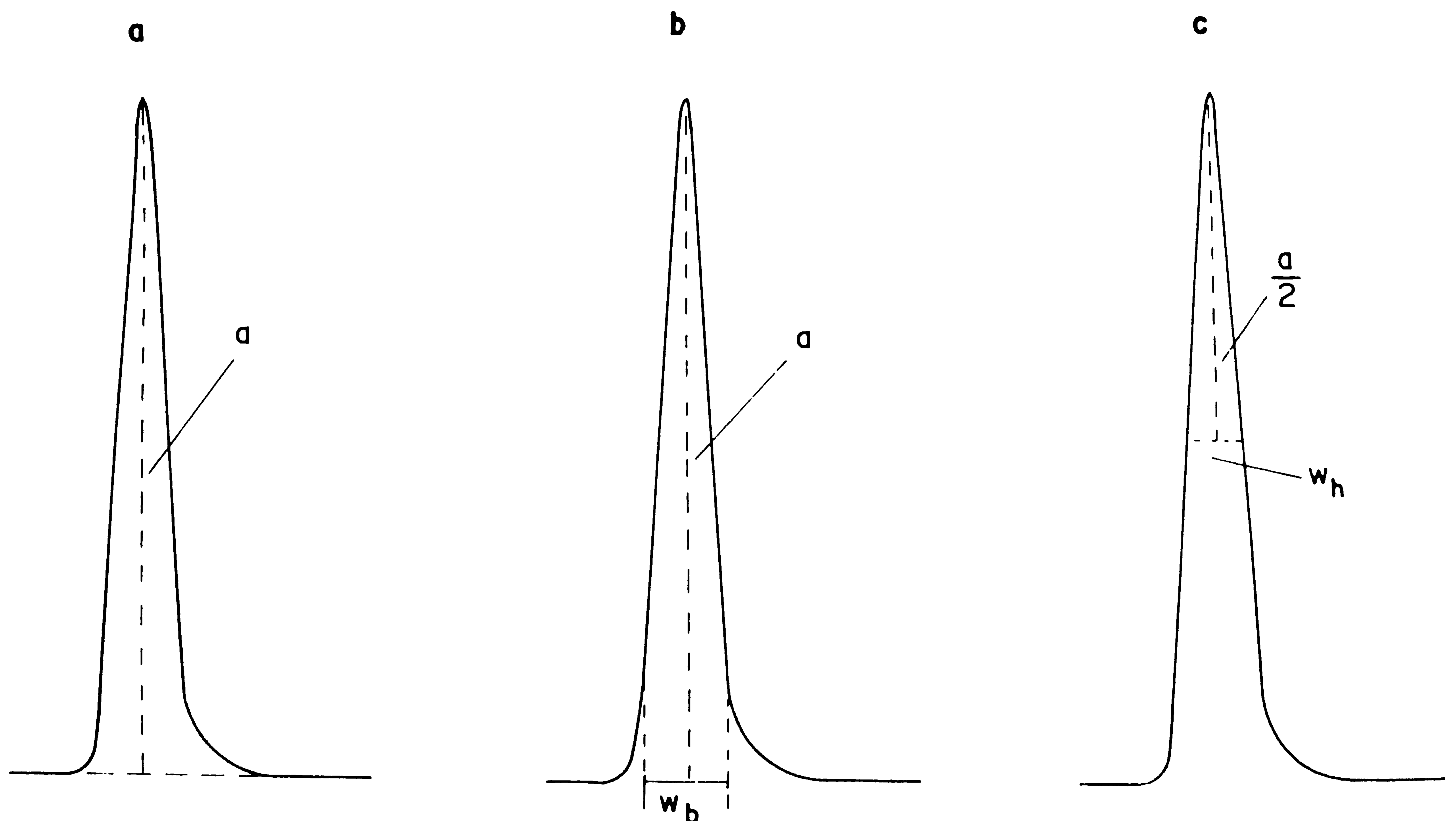



FIGURA VIII-12 Métodos para a integração dos sinais fornecidos pelo registrador.
a: altura do pico
b: área do pico
c: área na meia altura

Estas medidas obtidas na integração podem ser relacionadas com a concentração de uma dada substância na amostra, através dos seguintes métodos:

a. Normalização - Este método requer que todas as substâncias presentes na amostra sejam eluídas, e que a resposta do detector seja idêntica para todas. Consiste em comparar a área obtida no cromatograma com a porcentagem de composição da mistura.

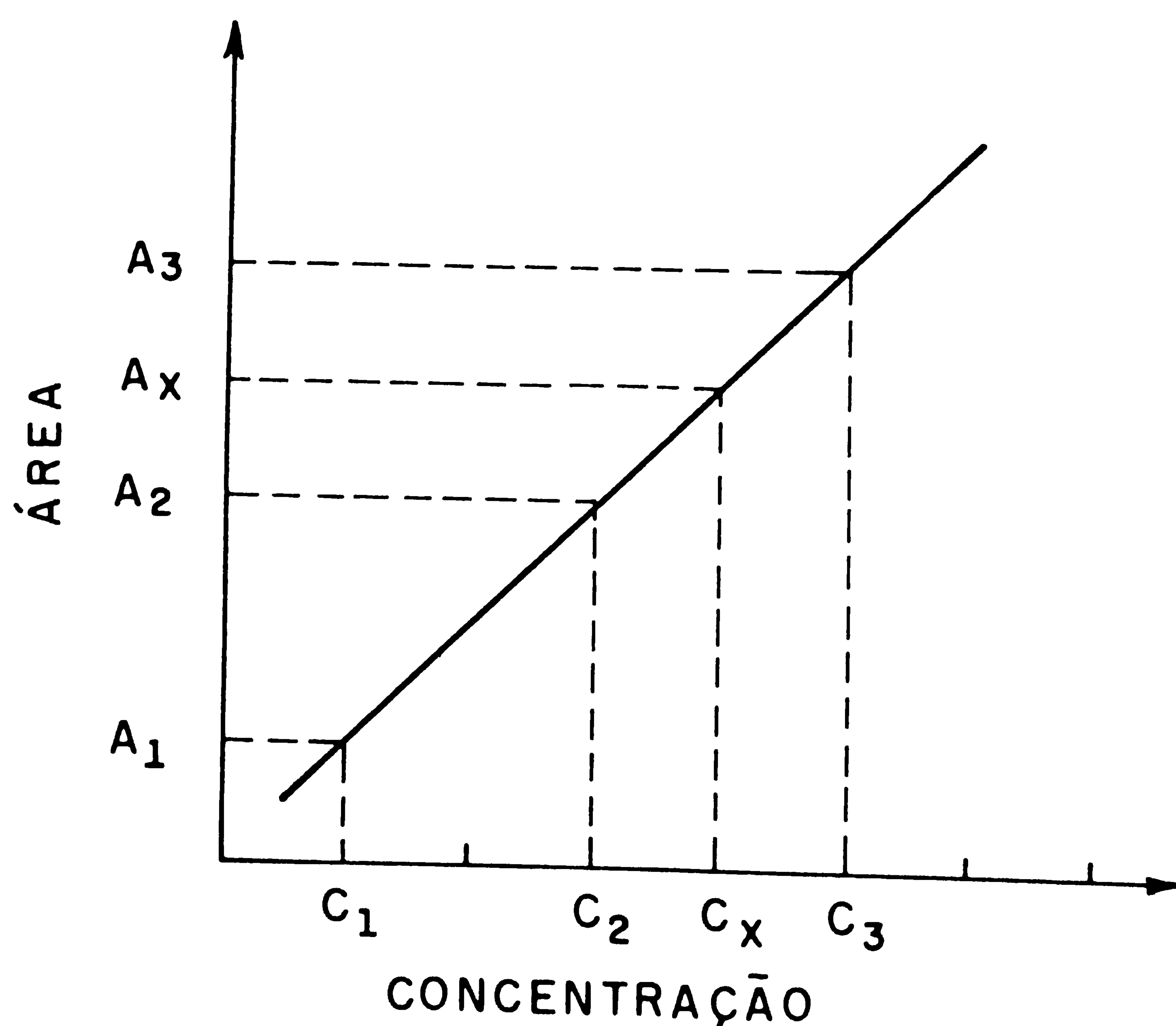
$$\% A = \frac{\text{área A}}{\text{área total}} \times 100$$

b. Fator de resposta - Se o detector não responde de maneira similar para todas as substâncias presentes na amostra, é necessário corrigir esta equação usando-se o chamado fator de resposta, que é determinado injetando-se uma mistura de concentração conhecida das substâncias, cujos fatores deseja-se determinar, e a seguir, relaciona-se a porcentagem conhecida e observada para cada composto. Assim, por exemplo:

$$f_A = \frac{\% \text{ A conhecida}}{\% \text{ A observada}}$$

Para calcular a porcentagem da substância presente na amostra, basta multiplicar a área obtida pelo fator de resposta e dividir pela somatória de todas as áreas multiplicadas pelos respectivos fatores de resposta.

c. Calibração externa - Este método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrão de concentrações conhecidas. Preparam-se várias soluções da substância a ser quantificada em diversas concentrações; obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas; em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações. Utilizando este gráfico, pode-se calcular a concentração desta substância na amostra *(Figura VIII-13)*. Este método é sensível a erros de injeção das soluções padrões e das amostras, bem como a erros relacionados com a preparação dos padrões.

FIGURA VIII-13 Método de calibração externa para o cálculo da composição da amostra.

d. Padronização interna - Este método consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância padrão na amostra a ser analisada, e relacionar as duas áreas obtidas. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter concentração e tempo de retenção próximos a esta substância, ser inerte, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada das demais substâncias presentes na amostra.

O método consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas, às quais adiciona-se uma quantidade conhecida de um padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância a ser quantificada / área do padrão interno) com a concentração desta substância *(Figura VIII-14)*. A amostra também é analisada após adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração da substância na amostra, utilizando-se o gráfico construído anteriormente.

Este método é menos sensível a erros de injeção, variações instrumentais, etc. É o melhor método para análise quantitativa, apesar de ser o mais trabalhoso.

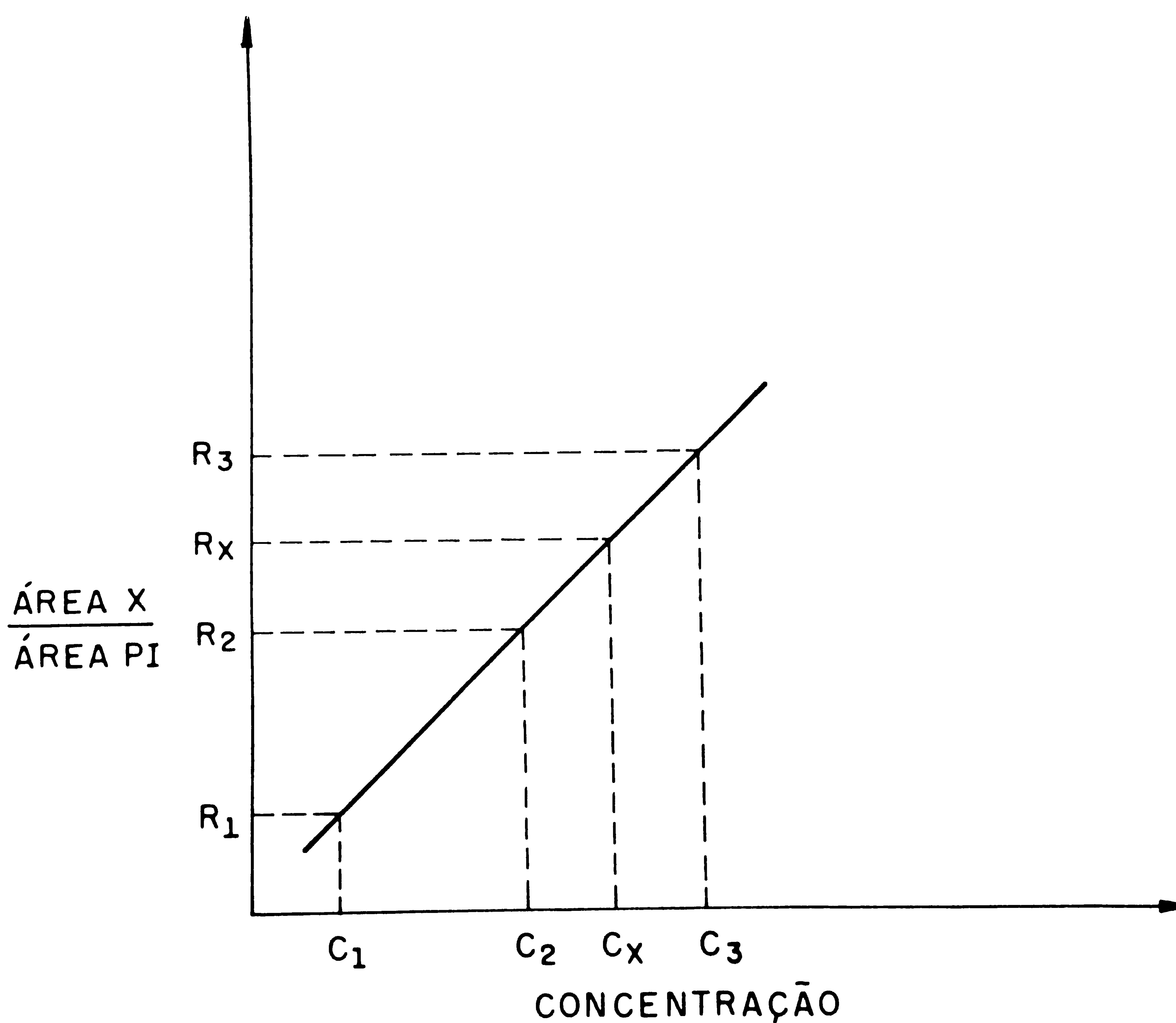



FIGURA VIII-14 Método de padronização interna para o cálculo da composição da amostra.

e. Extrapolação linear por adição padrão - Este método consta na adição de quantidades conhecidas da substância que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra. Após obtenção dos

cromatogramas, constrói-se uma curva de calibração relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância a ser determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada *(Figura VIII-15)*.

O método da adição padrão é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado.

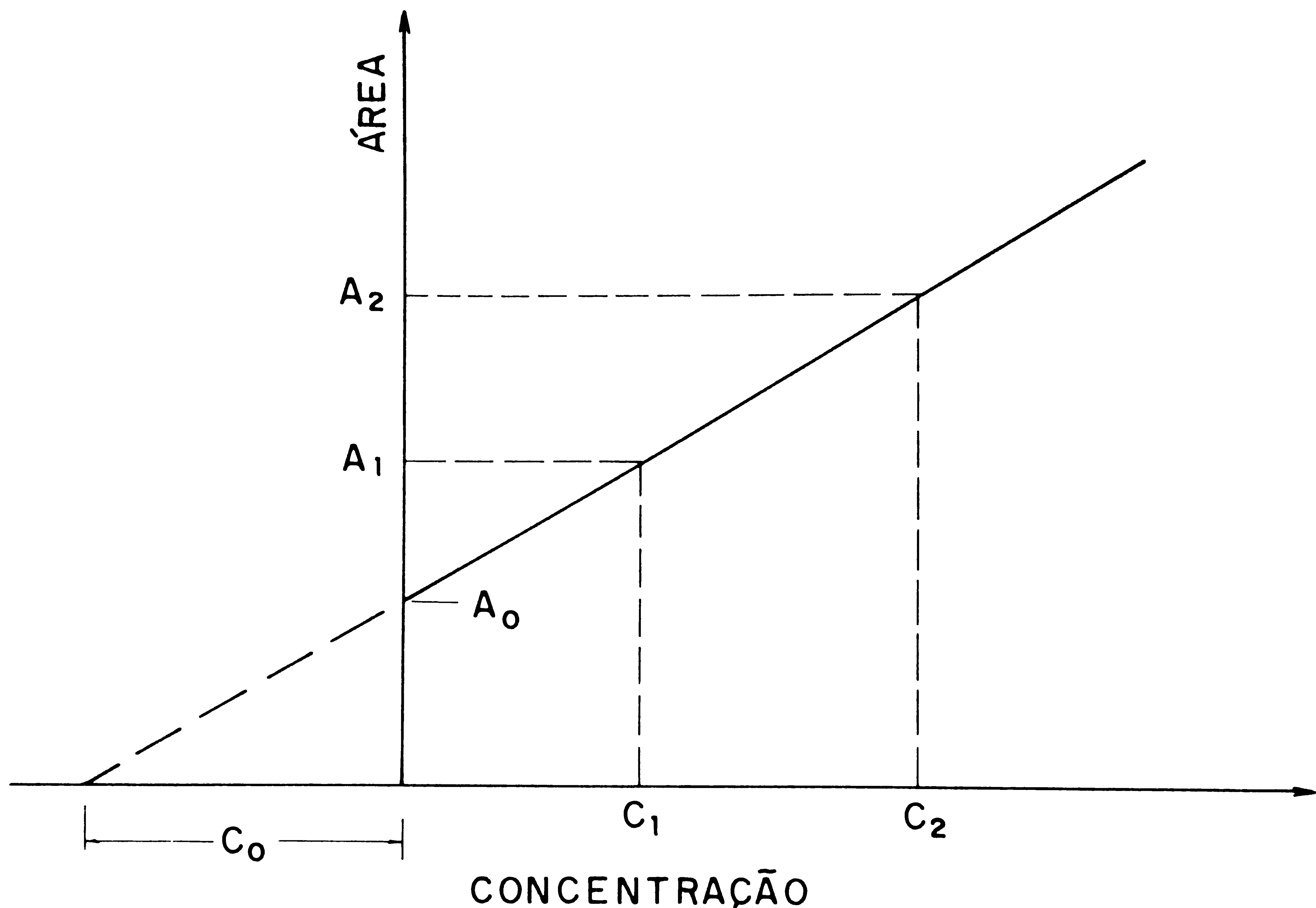



FIGURA VIII-15 Método de adição de padrão para o cálculo de composição da amostra.

Exceto o método de normalização, todos os outros requerem a disponibilidade de compostos puros para a construção dos gráficos.

8. DERIVAÇÃO

A cromatografia gasosa só é útil na análise de gases e de substâncias voláteis e termicamente estáveis. Quando isto não acontece, particularmente no caso de substâncias de alta massa molecular e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, há necessidade de derivação. Esta consiste em transformar a

substância de interesse em um derivado com características adequadas para serem analisadas por cromatografia gasosa. A derivação também pode ser usada para a introdução de grupos específicos no sentido de aumentar a sua detectabilidade.

O equipamento necessário para a derivação é geralmente simples. Muitas vezes, a simples mistura da substância e o reagente é suficiente. Reações lentas podem ser aceleradas através do aquecimento. Sistemas de refluxo miniaturizados, tubos de hidrólise sob vácuo e outros equipamentos para reações de derivação mais complexas são disponíveis comercialmente.

Os mais versáteis reagentes de derivação para moléculas polares contendo um grupo funcional protônico são os alquilsilil, sendo o mais comum o trimetilsilil. Homólogos de cadeia carbônica maior, grupos alquila contendo halogênios, ou grupos aromáticos são usados para aumentar a estabilidade hidrolítica do derivado formado, melhorar as características de separação e aumentar a sensibilidade quando do uso de detectores específicos. Compostos derivados com sucesso por este tipo de reagente incluem açúcares, fenóis, álcoois, aminas, tióis, esteróides, aminoácidos e ácidos carboxílicos.

Geralmente, as reações de sililação ocorrem instantaneamente, à temperatura ambiente. Reações lentas podem ser aceleradas pelo aquecimento ou pela adição de catalizadores. A reação deve ser feita na rigorosa ausência de água.

Outro tipo de reação de derivação é a alquilação. Neste caso, um átomo de hidrogênio é substituído por um grupo alquila ou arila, através de uma reação química. Reações de esterificação também são incluídas nesta categoria. A *Figura VIII-16* mostra alguns grupos funcionais que podem ser alquilados.

$$R\text{-}COOH \longrightarrow R\ COOR'$$

$$R\text{-}SO_2OH \longrightarrow R\ SO_2OR'$$

$$R\text{-}OH \longrightarrow R\text{-}OR'$$

$$R\text{-}SH \longrightarrow R\text{-}SR'$$

$$R\text{-}NH_2 \longrightarrow R\text{-}N(R')_2$$

$$RR'NH \longrightarrow RR'NR''$$

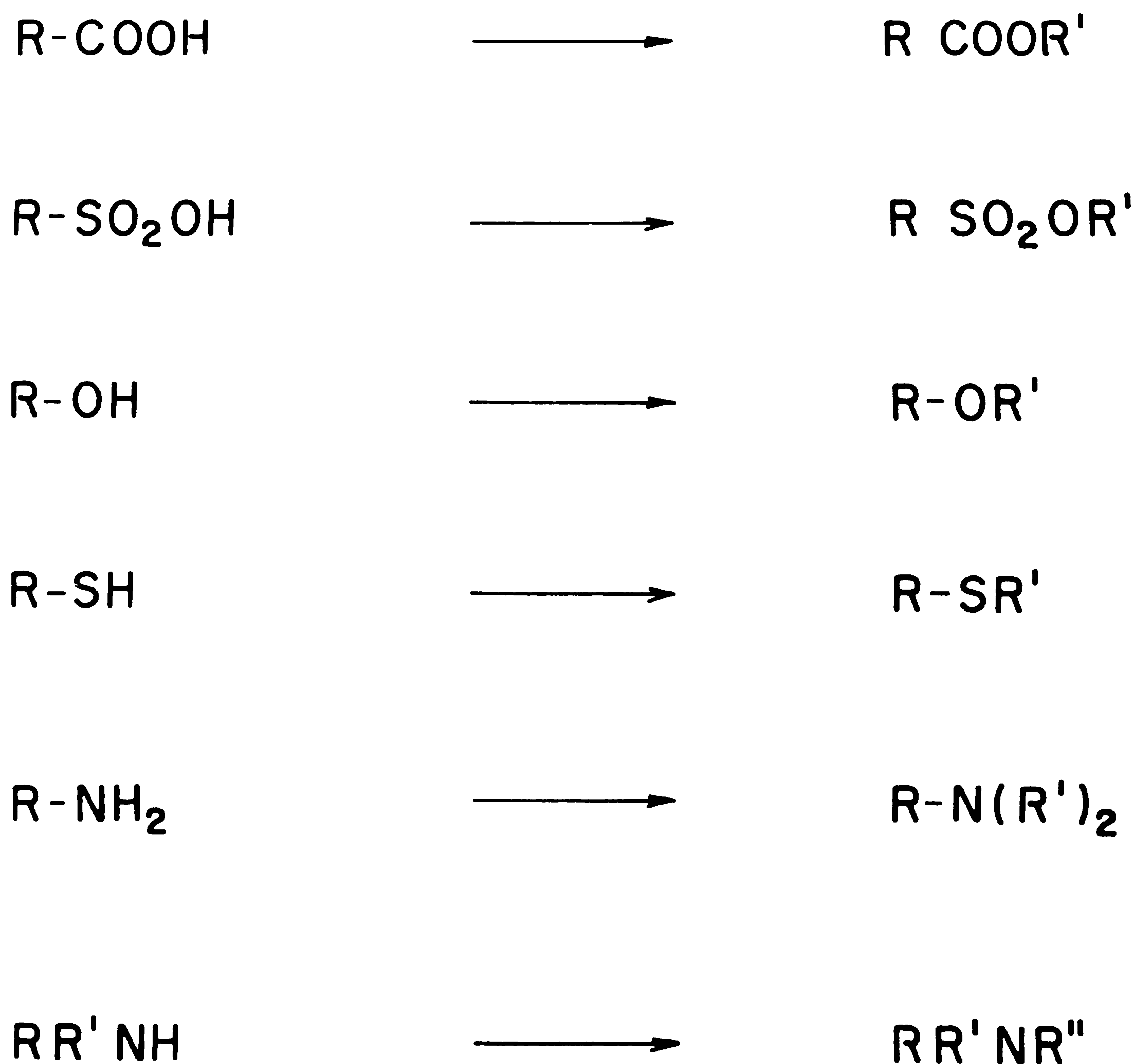
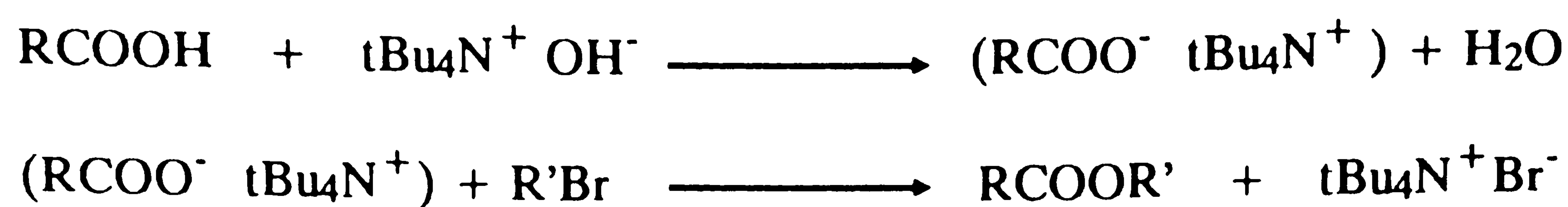



FIGURA VIII-16 Grupos funcionais que podem ser alquilados.

Uma grande variedade de métodos e reagentes são utilizados na alquilação. Haletos de alquila, na presença de óxido de prata, óxido de bário ou hidreto de sódio, convertem ácidos carboxílicos no correspondente alquilester. Este tipo de reagente tem sido empregado também na alquilação de açúcares.

A alquilação extrativa é utilizada para derivar ácidos, fenóis, álcoois ou amidas em solução aquosa. Por exemplo, para derivar uma substância de caráter ácido, o pH da solução aquosa é ajustado de modo a garantir a completa ionização da mesma, que então é extraída por um solvente orgânico imiscível, na forma de um par iônico obtido pela adição de hidróxido de tetralaquilamônio. Após extração do soluto na forma de par iônico, este é alquilado com um haleto de alquila. Por exemplo:

$$RCOOH + tBu_4N^+ OH^- \longrightarrow (RCOO^- \; tBu_4N^+) + H_2O$$

$$(RCOO^- \; tBu_4N^+) + R'Br \longrightarrow RCOOR' + tBu_4N^+Br^-$$

Certos tipos de alquilação acontecem na própria coluna cromatográfica. Um agente alquilante é injetado na coluna simultaneamente com a amostra. A temperatura do injetor e coluna inicia e completa a derivação. Hidróxido de trimetilanilina é bastante empregado para a formação de 1,3-dimetil derivados de barbitúricos.

Reações simples de esterificação são empregadas para a formação de derivados com ácidos carboxílicos e outros grupos funcionais ácidos. Em uma reação típica, o ácido carboxílico é dissolvido em um excesso de álcool que contém um catalizador como ácido clorídrico, ácido sulfúrico, trifluoreto de boro, etc.

Álcoois, fenóis, aminoácidos e aminas primárias e secundárias podem ser derivadas por reações de acetilação. Os reagentes consistem em anidridos ácidos, como por exemplo, o anidrido acético ou anidrido heptafluorobutírico, este último, com a finalidade de aumentar a sensibilidade no uso de detector por captura de elétrons.

Alguns íons metálicos como os de crômio, berílio, cobre, níquel, paládio, etc., podem ser derivados através da formação de complexos voláteis com ligantes quelantes como betadicetonas, betacetoaminas, betatiocetonas, etc.

9. APLICAÇÕES

A cromatografia gasosa é, atualmente, uma das técnicas de análise de maior uso. É utilizada para a separação e quantificação de produtos diversos, podendo também ser usada como técnica de identificação, em casos especiais, principalmente quando acoplada a um espectrômetro de massas ou outro detector qualitativo. Os recentes avanços na área com a utilização de colunas capilares faz da cromatografia gasosa uma técnica altamente atrativa.

Assim, a cromatografia gasosa está sendo usada nas mais diversas áreas, como na análise ambiental, nas indústrias químicas e farmacêuticas, na análise de alimentos e de produtos petroquímicos, na medicina, na pesquisa e outras.

Na análise ambiental pode-se citar, como exemplo, a utilização da cromatografia gasosa no controle da poluição de ar, água, solos, etc. A poluição do ar vem contribuindo, cada vez mais, com aumento da incidência de doenças crônicas tais como câncer de pulmão, bronquite e asma. Assim, o controle da poluição atmosférica, quer seja nas grandes cidades, em centros industriais, ou mesmo no ambiente de trabalho, tem merecido atenção especial por parte de autoridades. A cromatografia gasosa pode ser usada para a determinação de vários poluentes como aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, compostos policíclicos aromáticos, etc., *(Figura VIII-17).*

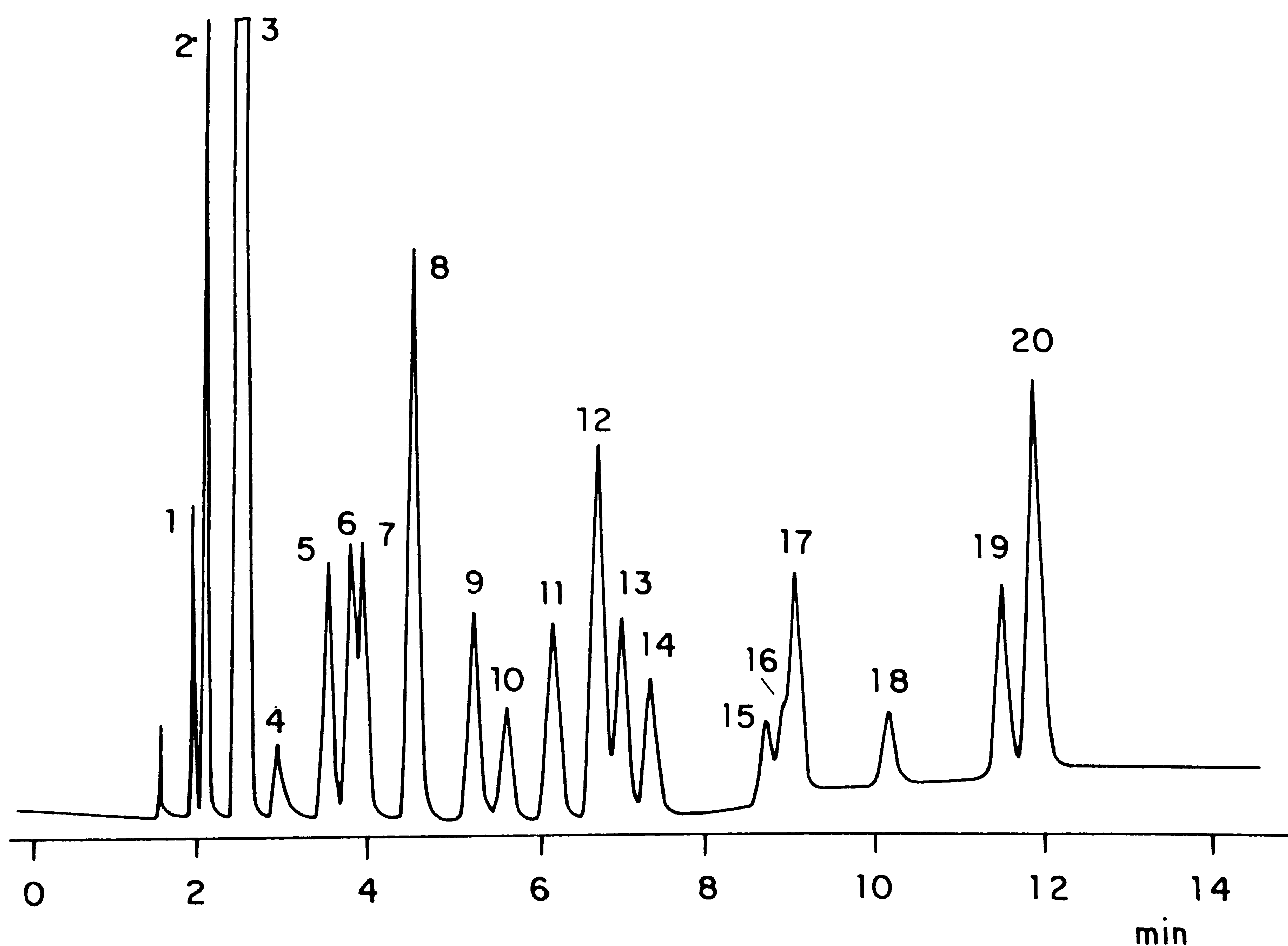



FIGURA VIII-17 Separação cromatográfica de traços de solventes em ar.
Coluna: 10% SP-1000 sobre Supelcoport 80-100 malhas, 6 m x 3 mm (o.d.) aço inoxidável
Fase móvel: N_2 a 30 mL/min
Temperatura: isotérmica a 100°C por 6 min, depois programada a 140°C em 20°C/min
Detecção: por ionização em chama
Amostra (em CS_2): 1: éter etílico; 2: isooctano; 3: dissulfeto de carbono; 4: acetona; 5: tetraclorometano e 1,1,1-tricloroetano; 6: 2-butanona; 7: diclorometano; 8: benzeno; 9: tricloroetileno; 10: clorofórmio; 11: tetracloroetileno; 12: tolueno; 13: 1,2-dicloroetano; 14: dioxano; 15: etilbenzeno; 16: p-xileno; 17: m-xileno; 18: o-xileno; 19: 1,1,2-tricloroetano; 20: estireno.

A *Figura VIII-18* exemplifica a utilização da cromatografia gasosa na análise de compostos clorados em água potável. A presença deste tipo de substância é proveniente de contaminação ou resultante de processos de tratamento da água. Exemplos interessantes estão ligados à análise de resíduos de pesticidas, herbicidas e fungicidas em água, solos, alimentos, etc., *(Figura VIII-19)*.

As indústrias químicas e farmacêuticas podem utilizar a cromatografia gasosa, desde a análise da matéria-prima até a do produto acabado. A *Figura VIII-20* mostra uma aplicação da cromatografia gasosa na análise de vitamina B3.

Na indústria alimentícia pode-se usar a cromatografia gasosa para análise de alguns constituintes de alimentos, como lipídeos e carboidratos. Em alguns casos, com técnicas adequadas de concentração da amostra, podem ser detectados constituintes alimentícios a nível de traços, como por exemplo, esteróides e vitaminas *(Figura VIII-21)*. Além disso, a cromatografia gasosa é freqüentemente usada, em conjunto com a cromatografia em camada delgada, para estudar a adulteração, contaminação e decomposição de alimentos.

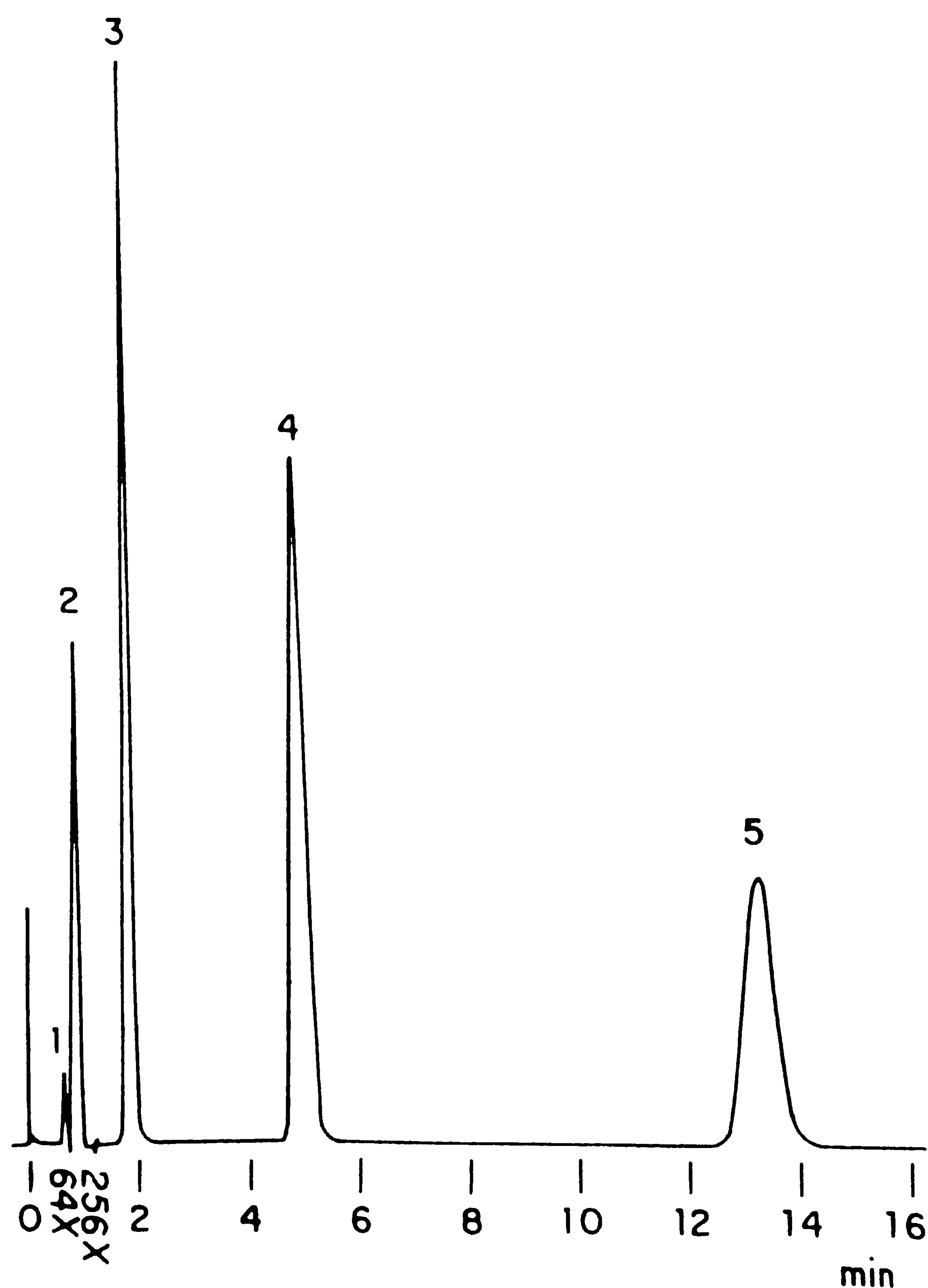



FIGURA VIII-18 Separação cromatográfica de trialometanos em água potável
Coluna: 3% SP-1000 sobre Supelcoport 100-120 malhas, 2m x 2mm (d.i.) vidro
Fase móvel: N_2 a 60 mL/min
Temperatura: isotérmica a 50°C
Detecção: por captura de elétrons
Amostra (em metanol): 1: metanol; 2: clorofórmio; 3: bromodiclorometano; 4: dibromoclorometano; 5:bromofórmio.

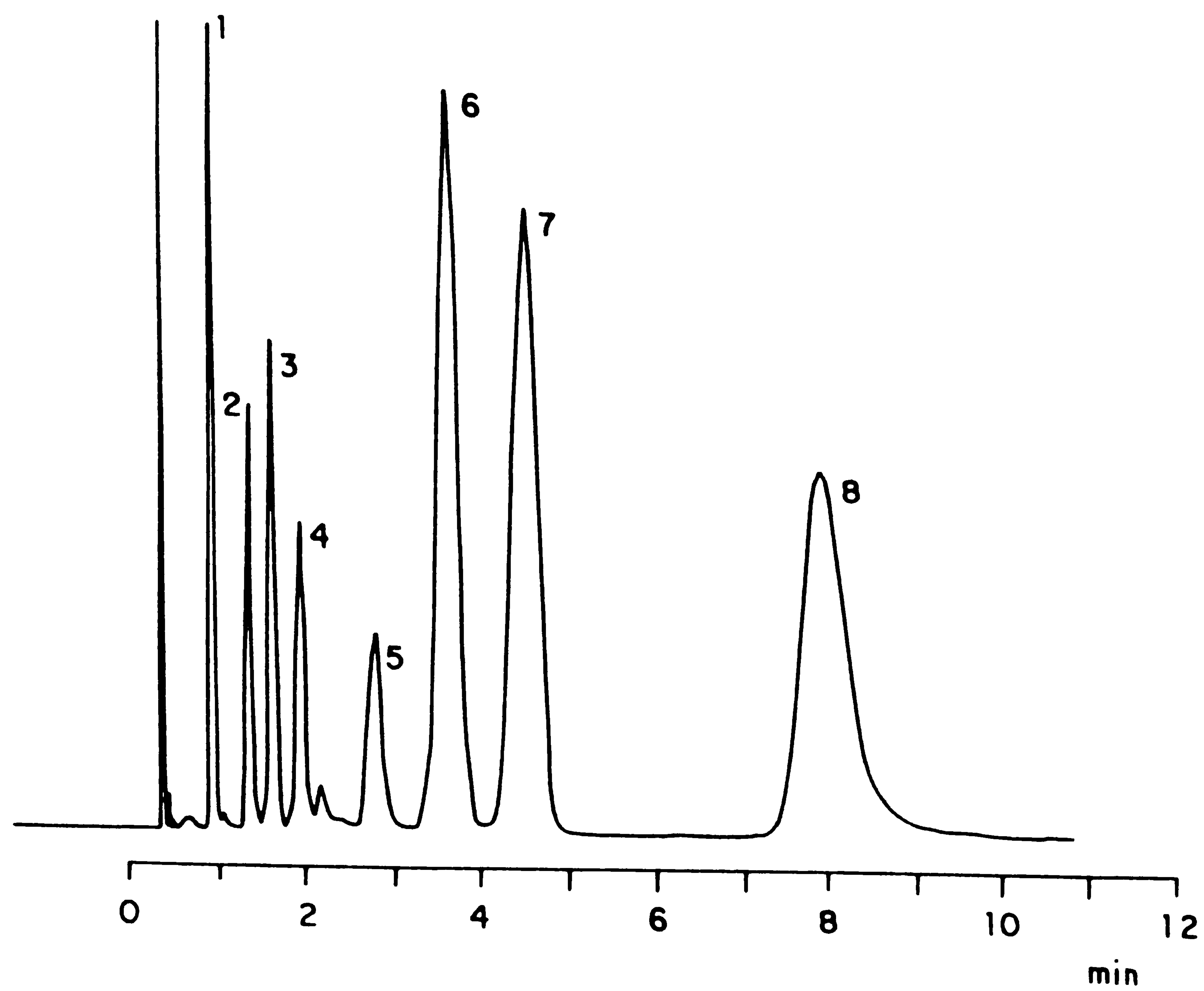



FIGURA VIII-19 Separação cromatográfica de pesticidas clorados.
Coluna: 5% DC-11 sobre Chromsorb W-AW, 2m x 3 mm (d.i.) vidro
Fase móvel: N_2 a 60 mL/min
Temperatura: isotérmica a 185°C
Detecção: por captura de elétrons
Amostra (em CH_2Cl_2): 1: Lindano; 2: Heptacloro; 3: Aldrin; 4: epóxido de Heptacloro; 5: Dieldrin; 6: o,p'-DDT; 7: p,p'-DDT; 8: Tedion.

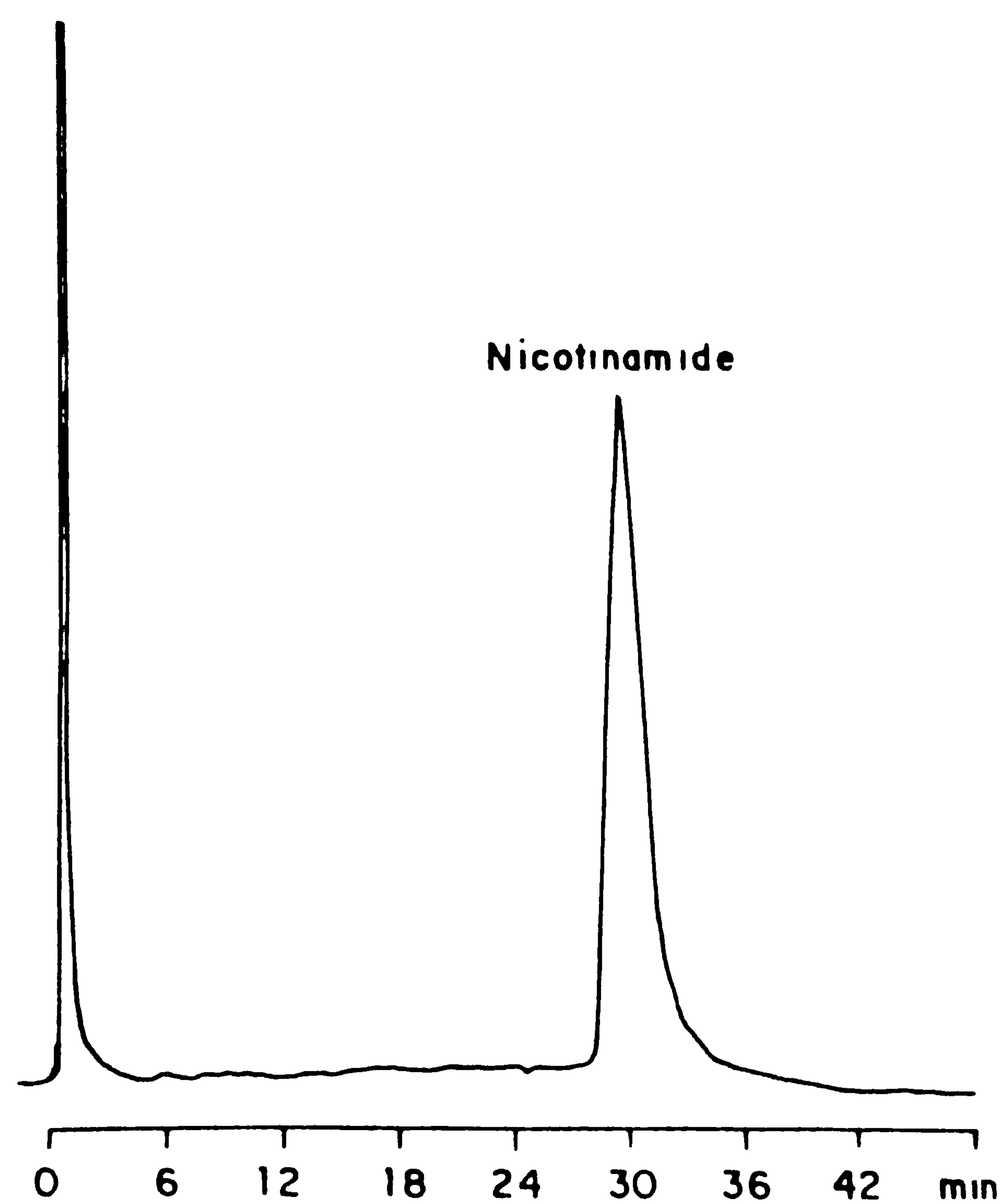



FIGURA VIII-20 Quantificação cromatográfica de Vitamina B3.
Coluna: Porapak Q, 100-120 malhas, 1,5 m x 3 mm (d.o.) aço inoxidável
Fase móvel: N_2 a 37 mL/min
Temperatura: isotérmica a 240°C
Detecção: por ionização em chama
Amostra: nicotinamida (derivado da niacina, vitamina B3).

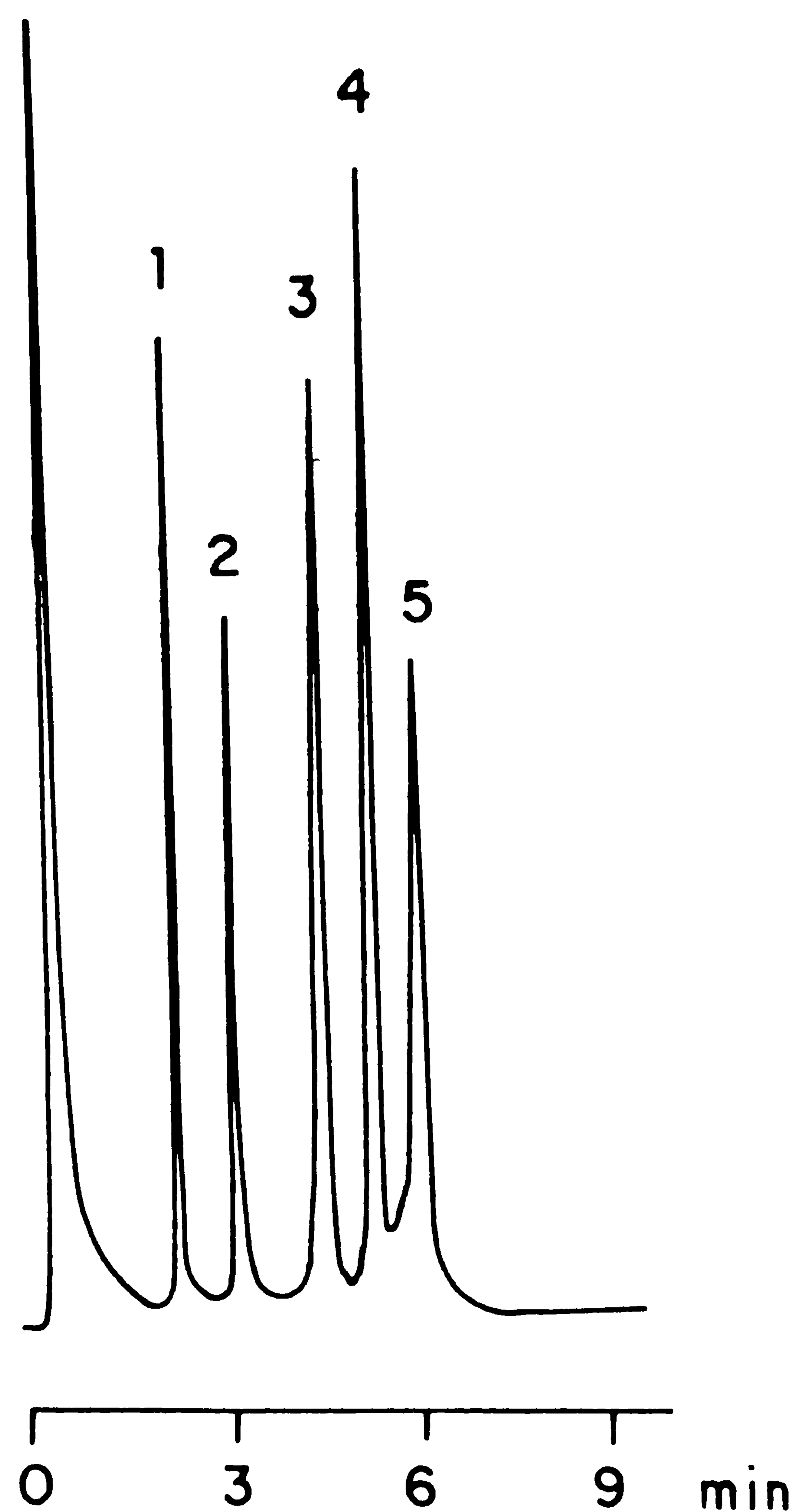



FIGURA VIII-21 Separação cromatográfica de alguns esteróides.
Coluna: 3% OV-17 sobre Chromsorb W-HP, 100-120 malhas, 2 m x 4 mm vidro
Fase móvel: N_2 a 34 mL/min
Temperatura: isotérmica a 280°C
Detecção: por ionização em chama
Amostra: 1: androsterona; 2: estradiol; 3: progesterona; 4: colesterol; 5: hidrocortisona

A área médica também encontra na cromatografia gasosa uma ferramenta poderosa, tanto no estudo de substâncias endógenas, como no controle terapêutico de certas drogas, ou em casos de intoxicações. A *Figura VIII-22* mostra a separação de vários aminoácidos, através da formação de derivados. Um exemplo bastante interessante a respeito da utilização de cromatografia gasosa em controle terapêutico é mostrado na *Figura VIII-23*, onde se verifica a separação de 14 antiepilépticos ou seus produtos de biotransformação.

A utilização de colunas capilares tornou a cromatografia gasosa muito mais atrativa, possibilitando a separação de inúmeros constituintes de amostras complexas. A *Figura VIII-24* mostra a separação de vários fármacos, após serem extraídos do soro.

Pesquisas nas mais diversas áreas podem usar a cromatografia gasosa, tornando-a de grande utilidade nos laboratórios.

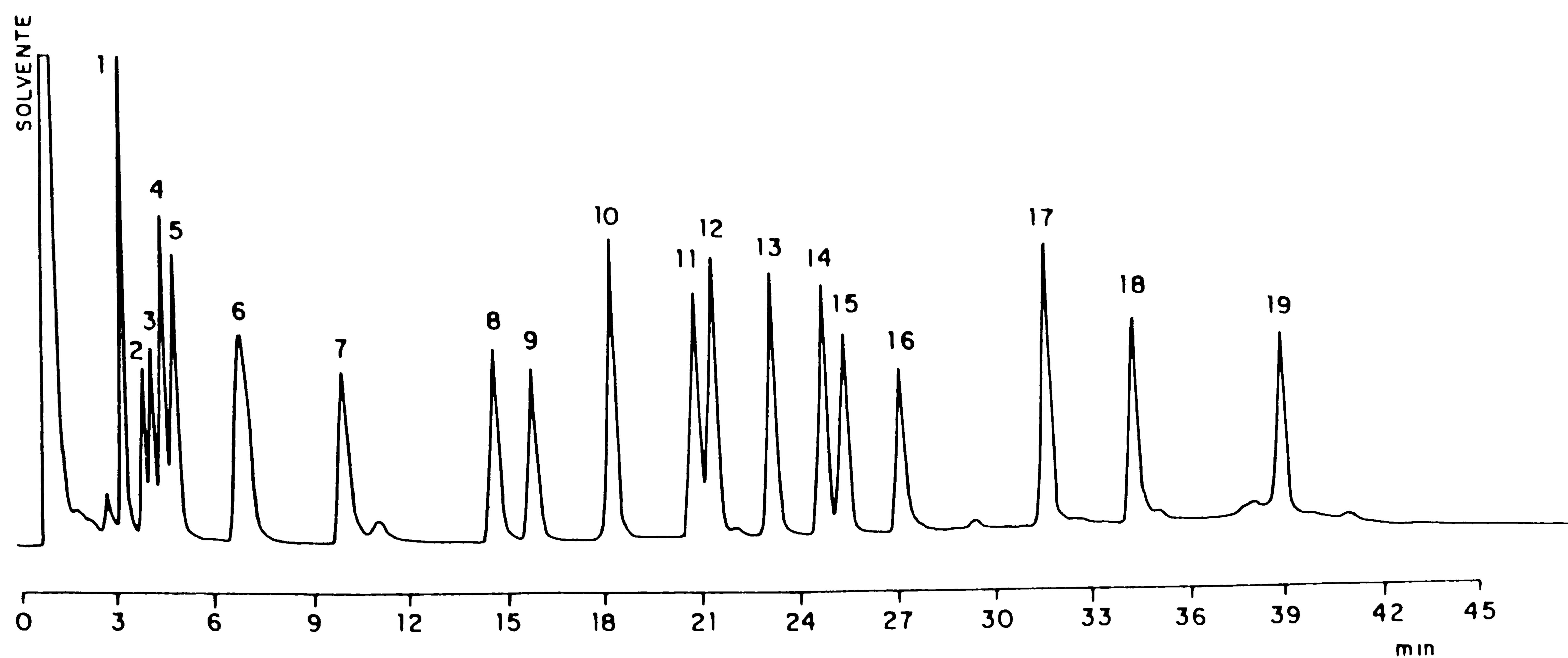



FIGURA VIII-22 Separação cromatográfica de aminoácidos após derivatização com trimetilclorosilano.
Coluna: 3% OV-17 sobre Chromsorb G-HP, 100-120 malhas, 3,6 m x 2 mm (d.i.) vidro
Fase móvel: N_2 a 34 mL/min
Temperatura: isotérmica a 125°C por 8 min., depois programada a 260°C a 4°C/min
Detecção: por ionização em chama
Amostra: TMS derivados de: 1: alanina; 2: isoleucina; 3: serina; 4: glicina; 5: valina; 6: treonina e leucina; 7: cisteína; 8; hidroxiprolina; 9: prolina; 10: metionina; 11: ác. aspártico; 12: fenilalanina; 13: tirosina; 14: ác. glutâmico; 15: lisina; 16: arginina; 17: triptofano; 18: histidina; 19: cistina.

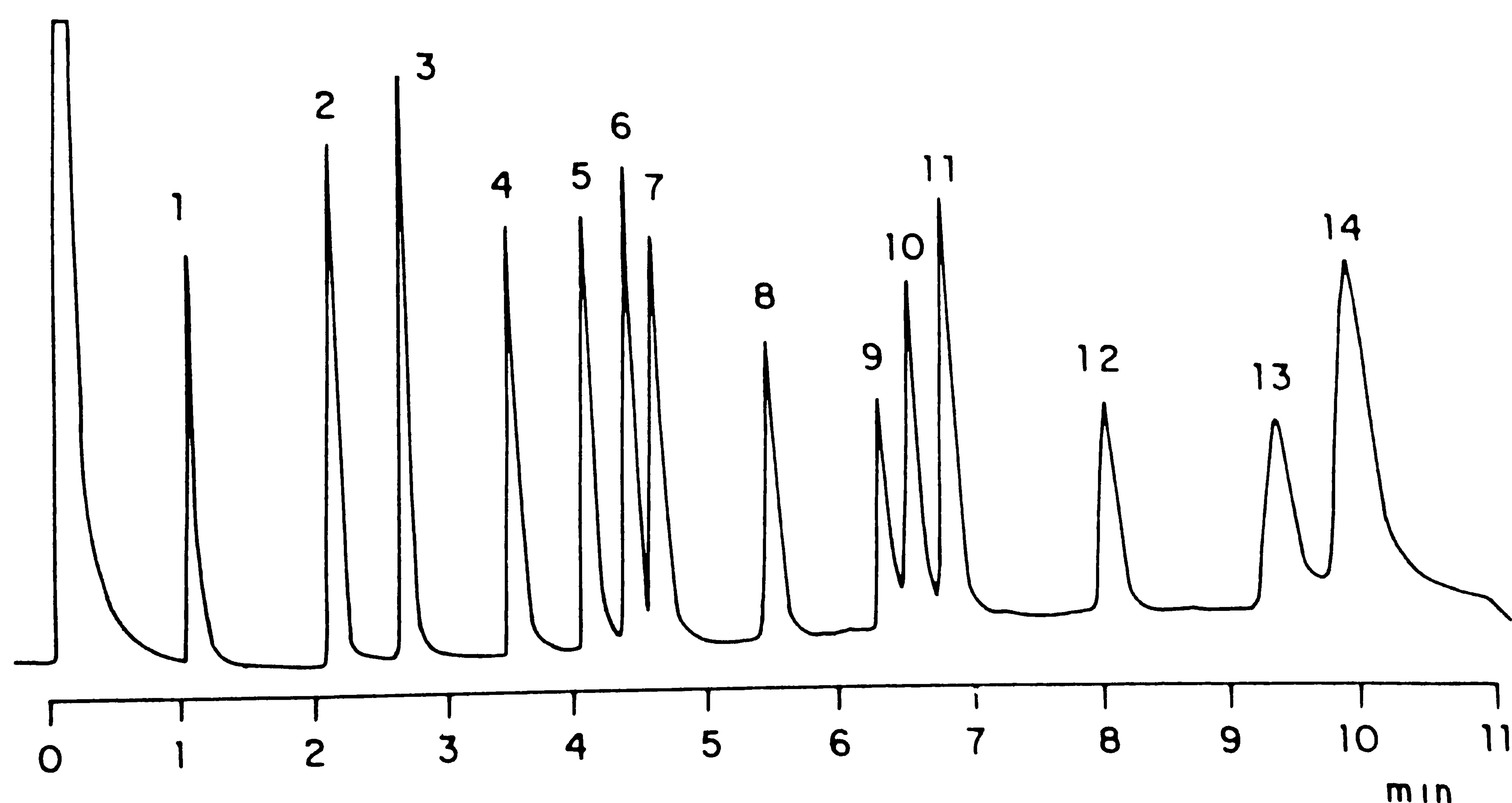



FIGURA VIII-23 Separação cromatográfica de antiepilépticos e seus produtos de biotransformação (sem derivatização).
Coluna: 2% SP-2510 sobre Supelcoport 100-120 malhas, 1 m x 2 mm (d.i.) vidro
Fase móvel: N_2 a 50 mL/min
Temperatura: programada de 150°C a 265°C a 16°C/min
Detecção: por ionização em chama
Amostra: 1: etosuximida; 2: metosuximida; 3: fenosuximida; 4: barbital; 5: N-desmetilmetosuximida; 6: mefenitoína; 7: N-desmetilfenosuximida; 8: feniletilmalonamida; 9: 5-metil-5-fenilidantoína; 10: fenobarbital; 11: carbamazepina; 12: primidona; 13: difenilidantoína; 14: 5-p-metilfenil-5-fenilidantoína.

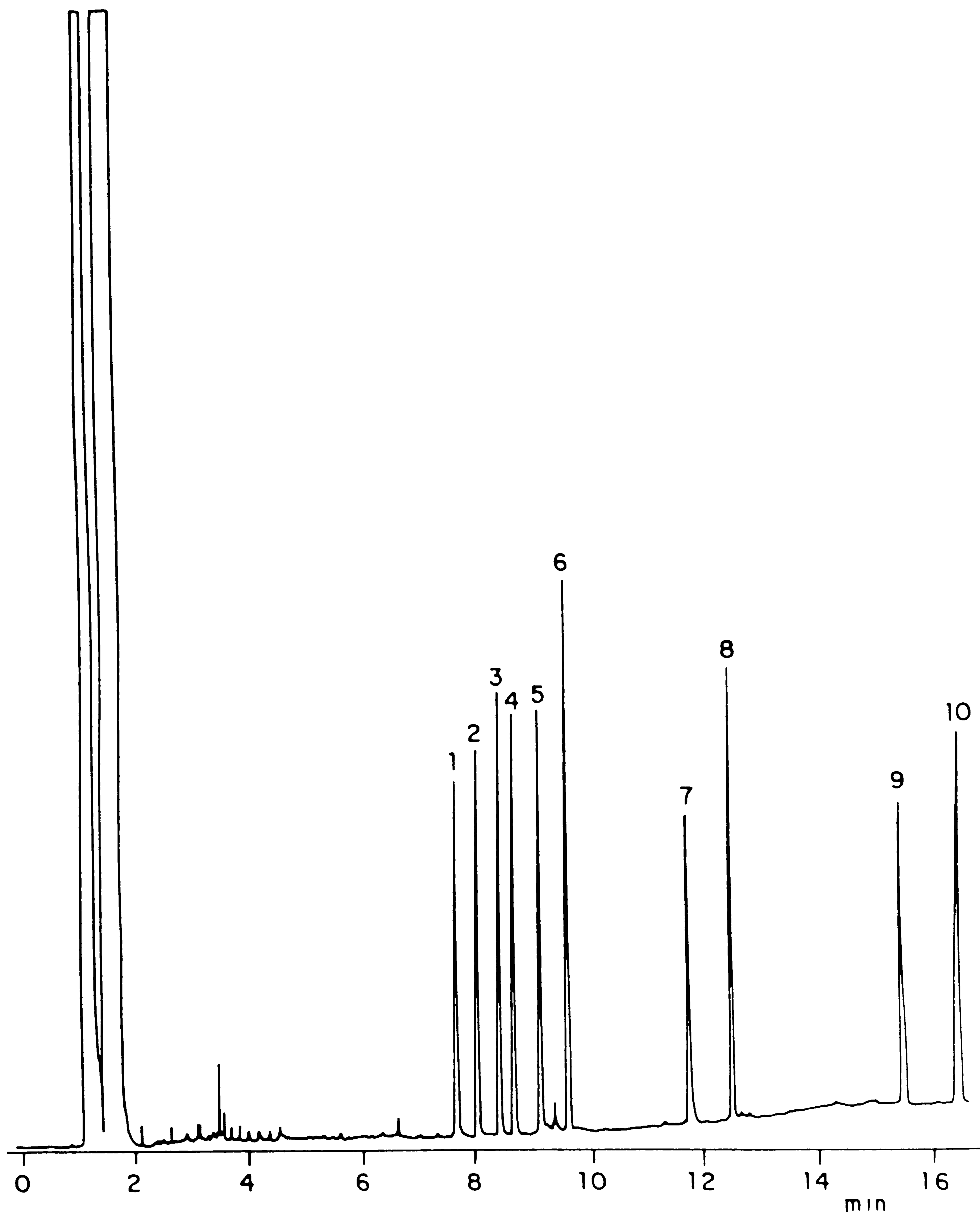



FIGURA VIII-24 Separação cromatográfica de fármacos após a respectiva extração do soro usando meio ácido
Coluna: 14%-cianopropil-14%-fenil-metilsilicone imobilizado em tubo capilar de sílica fundida, 12 m x 0,22 mm; espessura do filme: 0,25 μm
Fase móvel: He a 3 mL/min
Temperatura: programada a 50°C a 200°C a 7,5°C/min
Detecção: por ionização em chama
Amostra: 1: aprobarbital; 2: alilisobutilbarbital; 3: amobarbital; 4: pentobarbital; 5: secobarbital; 6: fenobarbital; 7: metaqualona; 8: torazina; 9: diazepam; 10: clordiazepóxido.

9. REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

- BAILESCU, G.E. e ILIE, V.A. *Stationary Phases in Gas Chromatography, Pergamon Press, Oxford, 1975.*
- BERG, R.G.; MURTA, A.L.M. E KUGLER, W. *Quím. Nov.*,*11*(3) 288(1988).

- BURGETT, C.A.; SMITH, D.H. e BENTE, H.B. *J. hromatogr.*, 134, 57 (1977).
- CARVALHO, D. e LANCHOTE, V.L. Comunicação pessoal.
- CIOLA, R. *Introdução à Cromatografia em Fase Gasosa*, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1973.
- CIOLA, R. *Fundamentos da Cromatografia a Gás*, Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1985.
- GOLAY, M.J. *Gas Chromatography*, Academic Press, New York, 1958.
- GROB, R.L., Ed. *Modern Practice of Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1977; 2ª edição, 1985.
- JAMES, A.T. e MARTIN, A.J.P. *Biochem.* J., *50*, 679 (1952).
- KOVATS, E. *Helv. Chim. Acta*, *41*, 1915 (1958).
- LITTLEWOOD, A.B. *Gas Chromatography - Principles, Techniques and Applications,* 2ª edição, Academic Press, New York, 1970.
- McNAIR, H.M. *Cromatografia de gases*, Secretaria Genéral de la Organización de los Estados Americanos, Série de Química, Washington, 1981.
- McNAIR, H.M. e BONELLI, E.J. *Basic Gas Chromatography*, 5ª edição, Varian Aerograph, Palo Alto, 1968.
- McREYNOLDS, W.O. *J. Chromatogr*. Sci. 8, 685 (1970).
- POOLE, C.F. e SCHUETTE, S.A. *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- ROHRSCHNEIDER, L. *J. Chromatogr.*, *22*, 6 (1966).
- SEVCIK, J. *Detectors in Gas Chromatography*, Journal of Chromatography Library, vol. IV, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- STAMBUK, J.D. Manual Practico de Cromatografia de Gases, Perkin-Elmer Corp., 1970.
- SUPINA, W.R. *The Packed Columm in Gas Chromatography*, Supelco Inc., Bellafonte, 1974.
- SZEPESY, L. *Gas Chromatography*, 2ª edição, Iliffe Books, Londres, 1971.
- WALKER, J.Q.; JACKSON, M.T., Jr. e MAYNARD, J.B. *Chromatographic Systems - Maintenance and Troubleshooting*, Academic Press, New York, 1972.
- VAN DEEMTER, J.J.; ZUIDERWEG, F.J. e KLINKENBERG, A. *Chem*. Eng. Sci., *5*, 271 (1956).

CAPÍTULO IX

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Luiz Fernando Lopes Guimarães
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto - USP
Carol H. Collins
Instituto de Química da Unicamp

1. PRINCÍPIOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o mais novo e mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. O seu emprego em vários laboratórios é considerado atualmente indispensável. Conhecer suas vantagens, limitações, componentes e os critérios de escolha entre as opções de equipamentos é uma obrigação dos profissionais de laboratórios químicos, farmacêuticos, bioquímicos e outros.

Vários nomes têm sido utilizados para denominar esta nova técnica de cromatografia líquida: alta velocidade, alta pressão, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência. O nome mais aceito, utilizado em português, é "cromatografia líquida de alta eficiência".

A CLAE utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

Somente a partir dos anos 70 se conseguiu um avanço considerável da cromatografia líquida moderna que até então era essencialmente subdesenvolvida, apesar de que um dos primeiros experimentos sobre cromatografia, no início do século, foi do tipo que é hoje chamada cromatografia líquida clássica. O avanço foi gradual e atingiu o atual nível de sofisticação que a CLAE apresenta, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia.

Desde 1968 tornou-se possível rechear colunas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para alta resolução e, também, adquirir equipamentos que funcionam nas altas pressões necessárias para obter uma boa velocidade na eluição.

Nos últimos doze anos ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos que operam em comprimentos de onda variável até 190 nm e houve um aumento na utilização dos detectores por fluorescência, eletroquímicos e por fluorescência induzida por laser, bem como acoplamento com o espectrômetro de massas. Com estes tornou-se possível a detecção da maioria dos compostos e a análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo, etc.

Recentes desenvolvimentos em instrumentação controlada por microprocessadores também têm trazido grandes melhoras na eficiência dos equipamentos.

Hoje em dia são comuns estudos com partículas pequenas, a execução da CLAE com fase reversa e, particularmente, o uso de equipamentos para uma perfeita eluição com gradiente, bem como de métodos

especiais, tais como a formação de pares iônicos. Como resultado, dificuldades anteriores ou separações impossíveis de compostos como corantes polares, isômeros, drogas básicas e seus metabólitos são agora mera rotina.

Atualmente, a CLAE é ainda objeto de novos avanços que nos faz prever que em um futuro muito próximo o seu emprego será ainda mais amplo, com o uso analítico de colunas com microdiâmetro ou ainda a utilização de colunas enormes (30 x 500 cm) que separam até quilogramas da amostra.

1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida clássica

A *Figura IX-1* ilustra as diferenças entre cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida clássica (CLC).

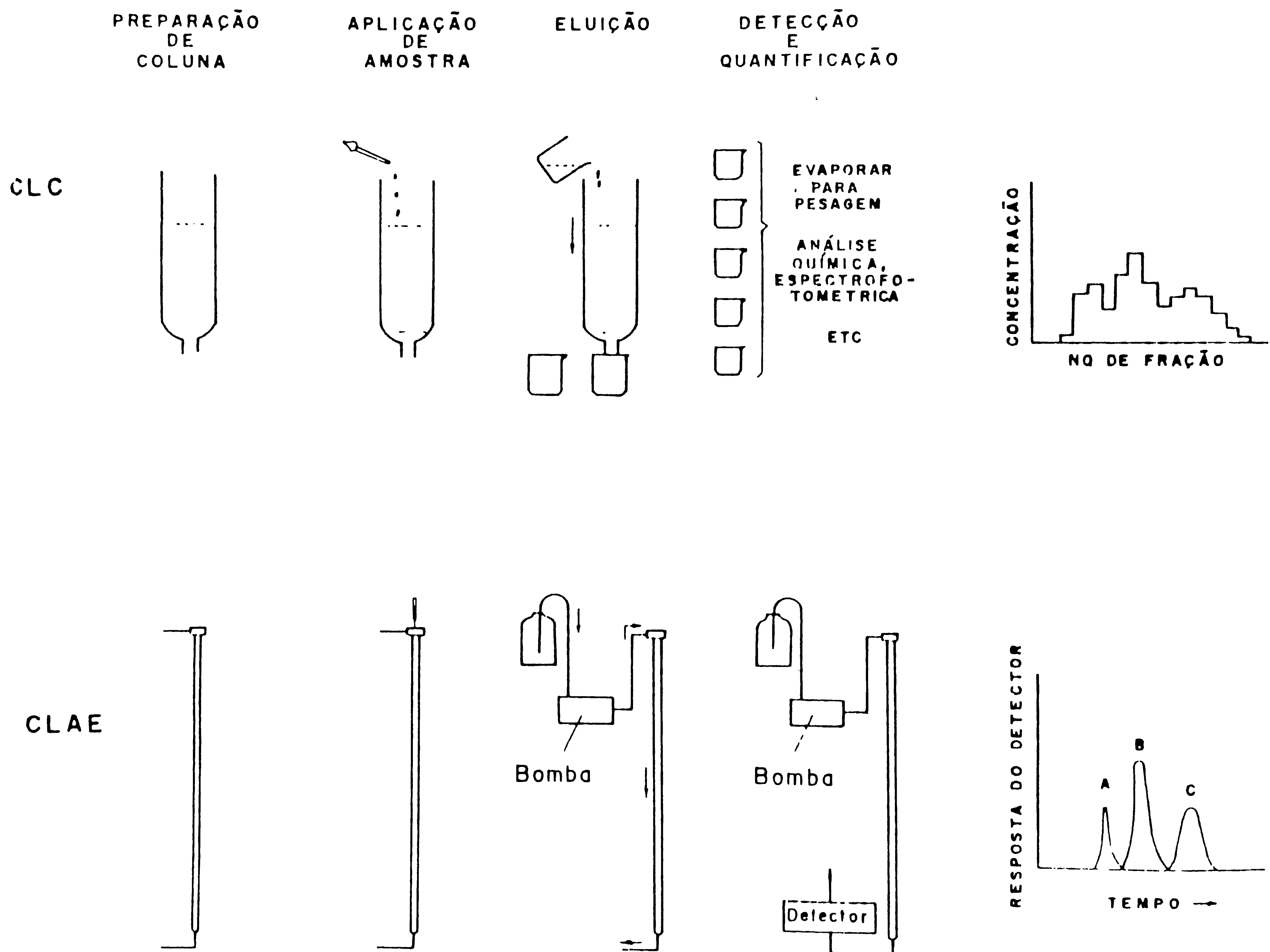



FIGURA IX-1 Diferentes formas de cromatografia líquida em coluna.

Na CLC o recheio da coluna é utilizado geralmente uma só vez, porque parte da amostra usualmente se adsorve de uma forma irreversível. O enchimento da coluna (etapa 1 da Figura *IX-1*) deve ser repetido para cada separação e isto representa um disperdício enorme de material e mão-de-obra. A aplicação da

amostra na CLC (etapa 2), para ser feita corretamente, requer alguma habilidade e tempo por parte do operador. A vazão de eluente na CLC (etapa 3) é promovida pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas manualmente ou através de um coletor de frações. Desde que as separações típicas com CLC requerem várias horas, o tempo gasto nesta operação é tedioso. Detecção e quantificação (etapa 4) são realizadas por análise manual das frações, individualmente. Normalmente, o número de frações coletadas é muito grande e seu processamento requer muito tempo e esforço. Em geral, se emprega alguma técnica auxiliar, tal como, espectrofotometria, ou análise química, ou, simplesmente, um registro gravimétrico, para dosar cada um dos componentes da amostra nas frações coletadas. Finalmente, os resultados são registrados em forma de um cromatograma (etapa 5): um gráfico de concentração da amostra versus o número da fração.

Na CLAE emprega-se uma coluna fechada, reaproveitável (etapa 1 da Figura *IX-1*); portanto, até centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna, se bem que em alguns casos é necessário regenerá-la após algumas separações. Desde que o custo de uma coluna individual pode ser distribuído por um grande número de amostras, é possível utilizar colunas com recheios de alta resolução, porém, mais caros e necessitando mais tempo em um enchimento cuidadoso da coluna para obter melhores resultados. Estas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, ou seja, ela sofre uma grande perda de carga. Por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel (etapa 3) é controlada facilmente, resultando em operações mais reprodutíveis, que tornam as análises executadas pela CLAE mais precisas. Uma injeção precisa da amostra (etapa 2) é conseguida rapidamente, usando uma microsseringa (para injeção com pressão de até 50 bar) ou uma válvula de injeção (para injeção a alta pressão). Vários tipos de detectores, que podem ser colocados na saída da coluna (etapa 4), proporcionam um registro contínuo da composição do efluente, o que permite obter um cromatograma similar aos obtidos em cromatografia gasosa e que se utiliza para identificar e quantificar os componentes das amostras.

Separações repetitivas, isto é, separações feitas rotineiramente pela CLAE, podem ser reduzidas a uma injeção da amostra e anotações dos dados finais, mesmo que a fase móvel precise ser trocada para cada nova aplicação. Sendo assim, a CLAE é mais conveniente e menos dependente do operador do que a CLC. A detecção contínua e com grande reprodutibilidade na CLAE eleva ambas as análises, qualitativa e quantitativa, a um alto nível de exatidão e precisão. A análise quantitativa pela CLAE pode atingir uma precisão superior a ± 0,5%. Finalmente, separações em escala preparativa de miligramas de amostras são relativamente fáceis. As múltiplas vantagens da CLAE fizeram desta técnica analítica uma das mais procuradas atualmente.

1.2. Cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência

Atualmente, a cromatografia gasosa (CG) é uma técnica amplamente difundida e mais utilizada do que a CLAE. Tendo em vista o número de pessoas familiarizadas com ela, é conveniente compará-la com a CLAE.

As principais características de ambas as técnicas estão resumidas na *Tabela IX-1*. Na CG é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente para não se decompor nas condições da separação. Pode-se aumentar a sua volatilidade, aumentando a temperatura de trabalho, que tem o seu limite máximo prático de aproximadamente 400°C devido a fase estacionária, detectores, etc. Por isto, somente os gases e cerca de

20% dos compostos orgânicos conhecidos podem ser analisados por CG, sem modificações nas estruturas dos compostos para aumentar a sua volatilidade.

Tabela IX-1

Comparação entre as características de CG e da CLAE

Fator	CG	
Requisitos para amostra	Amostra ou derivado volátil, termicamente estável na temperatura de operação do sistema cromatográfico	Amostra solúvel na fase móvel
Tipos de amostra	Gases, líquidos e sólidos: MM: 2 a 1200	Líquidos e sólidos, iônicos ou covalentes MM: 32 até 4.000.000
Quantidades mínimas detectáveis	10^{-12} g[a]	10^{-9} g[b]
Tempo de análise	Minutos até poucas horas	Minutos até muitas horas
Pratos teóricos por coluna	2.000 - 300.000	500 - 25.000
Capacidade preparativa	Pobre até razoável, usando-se múltiplas injeções	Boa, com facilidade de coleta e capacidade de automatização
Capacidade analítica	Excelente. Separação de amostras com até 200 componentes	Excelente. Separação de até 50 componentes numa amostra
Tempo de treinamento para um operador se tornar proficiente	cerca de 3 meses	pelo menos 6 meses

[a] Detector por ionização em chama ou por captura de elétrons.
[b] Detector por absorvância do UV.

Independente da limitação da volatilidade ou estabilidade térmica a CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel. Assim, a CLAE é um método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como uma imensa variedade de outros compostos de alta massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica (*Tabela IX-2*).

CLAE

Tabela IX-2

Amostras típicas analisadas pela CLAE

aminoácidos
explosivos
lipídeos polares
metabólicos de animais e plantas
pigmentos de plantas
polímeros sintéticos polissacarídeos
produtos farmacêuticos
proteínas
tintas

Separações difíceis são, freqüentemente, desenvolvidas mais facilmente pela CLAE do que pela CG sendo que a CLAE:

- Possui duas fases cromatográficas de interação seletiva com as moléculas da amostra, versus somente uma em CG.
- Possui uma maior variedade em possíveis mecanismos de separação.
- Permite a separação de compostos termicamente instáveis a baixas temperaturas.

Os métodos de detecção utilizados em CG são mais rápidos e sensíveis, a aparelhagem mais fácil de ser manipulada e em geral mais barata. A CLAE não é tão sensível e nem tão rápida, mas seu campo de aplicação é mais amplo enquanto o instrumento é consideravelmente mais caro. Não obstante, é possível prever que, conforme aumente o volume de vendas, reduzir-se-ão os custos.

Conclui-se que realmente não existem competições entre a CLAE e a CG, porque estas duas técnicas se complementam e geralmente analisam diferentes tipos de amostras.

1.3. As vantagens e as limitações da CLAE

Como toda técnica, a CLAE tem algumas limitações as quais, junto com as suas vantagens e alguns comentários, são citados na *Tabela IX-3*. Examinando de uma maneira geral, nota-se que as limitações da CLAE não têm impedido o aproveitamento adequado de suas vantagens e por isso, a técnica tem sido cada vez mais empregada.

2. AS TÉCNICAS DA CLAE

Há cinco tipos diferentes de fases estacionárias, que implicam em cinco mecanismos diferentes de realizar a CLAE. Mediante a simples troca de coluna e fase móvel é possível utilizar cada um deles.

Vários problemas em separação por cromatografia podem ser resolvidos por mais de um método. Outros podem somente ser tratados por um método específico. A seguir serão citadas algumas noções gerais sobre os mecanismos da CLAE e as classes de compostos onde eles são mais empregados; para problemas mais específicos a literatura deve ser consultada.

2.1. Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção

O mecanismo de separação da cromatografia líquido-sólido (CLS), ou por adsorção, se baseia na competição que existe entre moléculas da amostra e as da fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária). O equilíbrio estabelecido é:

Adsorvente

⇅ ⇅

Solvente Soluto

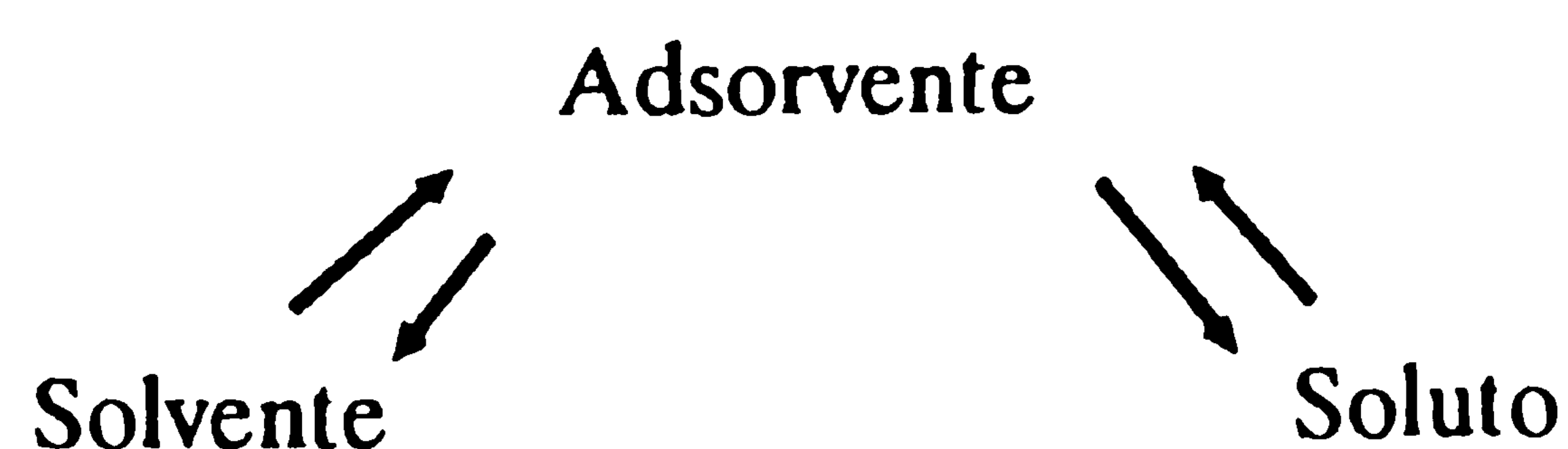



Tabela IX-3

Vantagens e limitações da CLAE

Vantagens	
Menor tempo de análise	Consegue-se separações realizadas em poucos minutos até horas, devido a alta eficiência da coluna e a vazão rápida da fase móvel através da coluna. Uma mesma análise através da CLC pode levar até dias ou ser impossível.
Alta resolução	É possível a análise de misturas complexas, como a urina humana, onde se pode detectar mais de duzentos compostos diferentes.
Resultados quantitativos	Análises quantitativas são de fácil execução e grande precisão, sendo comum à maioria dos métodos da CLAE desvios relativos inferiores a 0,5%.
Boa sensibilidade	É possível utilizar detectores que permitem medidas de 10^{-9}g (nanogramas) de amostra. Análises ao nível de 10^{-12} g (picogramas) já foram obtidas, com o emprego de detectores específicos.
Versatilidade	É a mais importante das vantagens. CLAE pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como para inorgânicos. As amostras podem ser líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes; os gases são as únicas amostras não determinadas pela CLAE.
Automatização	Existem sistemas comercializados que, automaticamente, injetam uma amostra, realizam a separação, imprimem os tempos de retenção, integram as áreas dos picos e reciclam qualquer uma das frações que está sendo eluída. Estes sistemas podem regenerar suas condições iniciais de operação para, em seguida, injetar uma nova amostra. Esta automatização é conseguida com o emprego de microcomputadores conjugados ao sistema cromatográfico, o que possibilita: a) a identificação das espécies pela comparação dos tempos de retenção determinados com os tempos de retenção padrão armazenados em memória; b) o cálculo das concentrações das espécies por meio das áreas dos picos, o que se consegue com a aplicação de técnicas de calibração; c) o aumento da resolução na separação de duas substâncias, quando não separadas completamente, pela reciclagem automática das frações correspondendo à eluição das substâncias juntas.

Limitações	
Alto custo da instrumentação	A aquisição da instrumentação representa um alto investimento, nem sempre compensador para alguns laboratórios devido a um número reduzido de análises a serem realizadas. Os preços dos sistemas mais simples situam-se na faixa de US$ 7.000 a US$ 20.000; e os sistemas mais sofisticados, automatizados e com vários detectores atingem mais do que US$ 50.000.
Alto custo de operação	O custo elevado das fases móveis de alto grau de pureza, das fases estacionárias ou colunas prontas de reposição periódica de componentes sofisticados constituem-se em despesas contínuas e, de forma alguma, desprezíveis.
Difícil análise qualitativa	Como as outras técnicas cromatográficas, a CLAE não é um método muito bom de identificação, sendo que a comparação dos tempos de retenção não é um método seguro de identificação. Por outro lado, o uso da CLAE para fins qualitativos não é desprezível, porém é necessário o emprego de pelo menos duas colunas de recheios diferentes e, preferencialmente, o uso de padrões adicionados para aumentar o pico. Entretanto, é comum empregar outras técnicas, tais como, espectrometria de massas, espectroscopia infravermelho ou ressonância magnética nuclear para confirmar as identidades.
Falta de detector universal sensível	Ainda não se dispõe de um detector que seja, simultaneamente, universal e sensível. Dos mais usados, o detector por índice de refração é universal, porque responde a todos componentes, mas sua sensibilidade é bem limitada, enquanto o detector por absorvância no ultravioleta é sensível mas é seletivo, porque só responde aos componentes que absorvem energia eletromagnética no comprimento de onda selecionado.
Necessidade de experiência no seu manuseio	Para se obter o máximo de aproveitamento do sistema CLAE é necessário que o operador tenha uma grande experiência com ele. Isto constitui um fator muito negativo, porque para um operador atingir este nível de vivência necessita de pelo menos 6 meses de treinamento.

Para que a molécula do soluto possa ser adsorvida na fase estacionária, primeiro uma molécula da fase móvel deve ser deslocada da superfície. Se se assumir que o adsorvente possui uma superfície polar (por ex., sílica ou alumina), grupos apolares (por ex., hidrocarbonetos) terão pouca afinidade por esta superfície e não irão deslocar a molécula da fase móvel; por isso, não serão retidos. Grupos funcionais polares capazes de formar pontes de hidrogênio terão fortes afinidades pela superfície e serão fortemente retidos. Moléculas

polarizáveis (por ex., moléculas aromáticas) irão apresentar interação dipolo induzindo-dipolo com a superfície do adsorvente e, portanto, também serão retidas; o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional.

É importante que as partículas da fase estacionária apresentem uma grande área de superfície, isto é, um grande número de sítios ativos. A atividade da superfície de muitos sólidos (incluindo a sílica e alumina) se encontra com freqüência afetada pela retenção de certas moléculas de alta polaridade, como álcoois, fenóis, água, etc., e, devido a eles, em determinadas ocasiões, é difícil reproduzir os resultados obtidos nas análises, porque as propriedades da superfície sofreram mudanças. Em conseqüência, a superfície da sílica empregada na CLAE é habitualmente submetida a determinados processos de desativação com o propósito de diminuir a retenção de moléculas muito polares e, assim, se mantém a superfície em condições uniformes, o que contribuirá para melhorar a reprodutibilidade das análises.

Muitas vezes, devido a uma forte adsorção ou retenção de alguns componentes da amostra no sólido ativo, é necessário aumentar a polaridade da fase móvel de uma maneira constante e uniforme, com o que se consegue um incremento de solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel. A esta variação dá-se o nome de eluição por gradiente ou programação da fase móvel.

Devido a vasta literatura em cromatografia em camada delgada, cujos resultados podem ser transferidos quase diretamente para a CLS, é possível prever as retenções da amostra nestas colunas. Por causa da simplicidade e flexibilidade da cromatografia em camada delgada, é muitas vezes mais conveniente, para estabelecer a melhor combinação de fase estacionária e fase móvel, usar esta técnica antes e transferir as condições de separação para a CLAE, onde pode se utilizar a sua maior eficiência.

Compostos diferenciados em tipo químico ou número de grupos funcionais são facilmente separados por CLS; por exemplo, ácidos graxos, álcoois, alcalóides, aminas, antioxidantes, barbitúricos, corantes, esteróides, fenóis, lipídeos, vitaminas, etc.

2.2. Cromatografia líquido-líquido ou por partição

A cromatografia líquido-líquido (CLL) foi desenvolvida por MARTIN e SYNGE em 1941 para a separação de vários aminoácidos, usando uma fase estacionária de água em sílica e clorofórmio como fase móvel. O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia, ou mecanismo de distribuição como também é chamado, baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Então, os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto os menos solúveis são transportados mais rapidamente pela fase móvel.

A CLL é utilizada para compostos levemente polares, cujas massas moleculares são inferiores a 2000.

O maior inconveniente desta técnica é a solubilidade da fase estacionária na fase móvel, o que rapidamente deteriora a coluna, levando a não reprodutividade nas separações repetitivas. Isto pode ser resolvido de duas maneiras. A primeira é saturando a fase móvel com a fase estacionária por meio de uma pré-coluna, colocada antes do injetor, que contenha uma alta percentagem da fase estacionária. A segunda é utilizando materiais que contenham a fase estacionária quimicamente ligada a um suporte sólido, técnica a ser descrita na próxima seção. Esta segunda maneira é que possibilita a execução de uma programação da fase móvel.

2.3. Cromatografia líquida com fase ligada

A fase estacionária para a cromatografia líquida com fase ligada (CLFL) surgiu como conseqüência de problemas associados com a CLL. Visto que a fase estacionária está quimicamente ligada à superfície de um suporte, elimina-se o problema da solubilidade da fase estacionária na fase móvel. O mecanismo principal desta técnica baseia-se na partição, levando alguns autores a considerá-la uma técnica de líquido-líquido. Por outro lado, como esta fase estacionária também apresenta influência de grupos ativos (polares) da superfície, isto é, também ocorre o mecanismo de adsorção, a maioria dos pesquisadores considera esta técnica um método separado.

Variando a natureza dos grupos funcionais da fase estacionária, é possível obter diferentes tipos de seletividade. Tais grupos podem ser de natureza polar, como o grupo amino ($-NH_2$) e o grupo nitrilo (-CN), que, funcionando similarmente às fases polares da CLS, são chamados de fase normal *; ou de natureza apolar, como os grupos octil ($-C_8H_{17}$), octadecil ($-C_{18}H_{37}$), fenil ($-C_6H_5$), etc., que são de fase reserva.

Infelizmente, a quantidade de fase estacionária que é possível ligar em um suporte (geralmente partículas de sílica) é limitada e, como conseqüência, as quantidades de amostras separadas nestas colunas são necessariamente pequenas.

Esta técnica, usando as fases apolares, tem inumeras aplicações, tendo resolvido vários problemas cujas soluções até então eram consideradas muito difíceis. Algumas classes de compostos que são facilmente separadas pela técnica de fase reversa são alcalóides, álcoois, antibióticos, aromáticos, barbitúricos, pesticidas clorados e vitaminas. Algumas classes que são facilmente separadas usando as fases polares são alcalóides, álcoois, anilinas, aromáticos, complexos metálicos, corantes, esteróides, fénois, glicóis e pesticidas. Compostos fracamente iônicos (ácidos e bases) podem ser separados se a dissociação for suprimida por tamponação na escala de pH 2-8, contanto que o equilíbrio:

$$\text{não-iônico} \rightleftharpoons \text{iônico}$$

permaneça à esquerda.

Este tipo de cromatografia é muito útil e se aplica a moléculas de baixa ou média polaridade, não iônicas, de massa molecular inferior a 2000 e solúveis em solvente orgânico.

Quando não é fácil manter todas as moléculas na forma não ionizadas, a cromatografia líquida por pares de íons (CLPI), uma forma especial de CLFL, pode ser usada. Nela, a molécula da amostra iônica ou ionizável forma um par de íons por associação com um contra-íon orgânico, adequado, da fase móvel. O par de íons é então distribuído entre a fase estacionária, normalmente uma de fase reversa, onde o par de íons é solúvel, e a fase móvel, normalmente aquosa-orgânica, que solubiliza as espécies ionizadas. O equilíbrio envolvido confere um alto grau de solubilidade. Um alto grau de seletividade pode ser introduzido na separação pelo ajuste dos parâmetros de polaridade da fase móvel, pelo pH, pela natureza e concentração do contra-íon, e, em menor extensão, pela natureza da fase estacionária.

A CLPI é uma alternativa à cromatografia por troca iônica e tem a vantagem de usar colunas de longa vida e maior reprodutibilidade. Além disso, a CLPI permite a determinação simultânea de compostos ácidos, básicos e neutros.

* Os nomes FASE NORMAL (FN) e FASE REVERSA (FR) são artificiais (mesmo sendo muito usados) e são baseados no conceito de que a CLS é "normal" e usa fase móvel apolar, enquanto que o inverso é a "reversa".

2.4. Cromatografia por exclusão

A cromatografia por exclusão (CE) efetua a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A coluna é recheada com matéria inerte cujos poros têm tamanho controlado. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros e apresentarem um maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as moléculas pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel. O intervalo de massas moleculares em que se pode trabalhar por CE varia desde aproximadamente 1000 até vários milhões. A CE clássica emprega materiais frágeis, incapazes de resistirem a pressões maiores do que 4 bar. Em contraste, a CLAE necessita materiais com estruturas mais rígidas, normalmente de sílica, mas também de resina altamente cruzada. Mesmo que a literatura contenha exemplos das aplicações de CE para a separação das moléculas orgânicas e inorgânicas em sistemas aquosos e não aquosos, a técnica é predominantemente usada para análises de compostos de alta massa molecular, incluindo polímeros orgânicos (por ex., poliolefinas, poliestirenos e poliamidas), silicones e biopolímeros (por ex., proteínas, ácidos nucléicos, oligossacarídeos, peptídeos, açúcares e glicóis). A aplicação de CE tem aumentado na caracterização de altos polímeros, pela determinação da distribuição de suas massas moleculares.

2.5. Cromatografia por troca iônica

Na cromatografia por troca iônica (CTI), a fase estacionária é, normalmente, uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno, a qual são ligados grupos iônicos, como, por exemplo, o grupo $-SO_3^-$ no caso do trocador de cátions, e o grupo $-NR_3^+$, no caso do trocador de ânions. Os grupos iônicos têm um contra-íon (com carga oposta) que pode ser deslocado pelos íons da fase móvel de carga similar a ele. Por exemplo, para uma resina trocadora de cátions, tem-se o equilíbrio entre o contra-íon Na^+ e o cátion da amostra, M^+ :

$$M^+ + R\text{-}SO_3^- Na^+ \rightleftharpoons Na^+ + R\text{-}SO_3^- M^+$$

Para a CTI, as colunas para a CLAE são bem mais eficientes do que as para a CLC.

Exemplos característicos dos compostos separados por CTI são ácidos carboxílicos, açúcares, analgésicos, vitaminas, ânions inorgânicos e cátions metálicos ou complexos. Contudo, esta técnica pode ser também aplicada na separação de peptídeos, aminoácidos e ácidos nucléicos, que podem se ionizar em soluções com pH devidamente tamponado.

2.6. Sumário das técnicas da CLAE

Na escolha da melhor técnica cromatográfica para a separação dos componentes de uma determinada amostra, deve-se considerar as suas propriedades, tais como: massa molecular, solubilidade, estrutura, etc. Um guia geral que pode ajudar nesta escolha é dado na *Figura IX-2*.

AMOSTRA — MASSA MOLECULAR	PROPRIEDADES			MODALIDADE	FASE ESTACIONÁRIA TÍPICA	FASE MÓVEL TÍPICA
< 2000	INSOLÚVEL EM ÁGUA	SOLÚVEL EM HEXANO	NÃO POLAR	CLS	SÍLICA	$nC_7H_{16}/CHCl_3$ $C_6H_5CH_3$
				CLFL(FR)	C-18	CH_3OH/H_2O CH_3CN/H_2O
		SOLÚVEL EM METANOL	MODERADAMENTE POLAR	CLFL(FR)	C-8	CH_3CN/H_2O
				CLS	SÍLICA	$nC_7H_{16}/CHCl_3$
			POLAR	CLS	SÍLICA DESATIVADA	$nC_7H_{16}/CHCl_3$
				CLFL(FN)	CN	$CHCl_3$ $nC_7H_{16}/PrOH$
				CLFL(FR)	C-8	CH_3CN/H_2O
	SOLÚVEL EM ÁGUA	NÃO IÔNICO		CLFL(FR)	C-18	CH_3OH/H_2O CH_3CN/H_2O
		IÔNICO	BASE FORTE	CTI	TROCADOR DE CÁTIONS	TAMPÃO AQUOSO
			BASE FRACA	CLFL(FR) (Pares de íons)	C-18	ÁCIDO HEXANOSSULFÔNICO EM ÁGUA
			ÁCIDO FORTE	CTI	TROCADOR DE ÂNIONS	TAMPÃO AQUOSO
			ÁCIDO FRACO	CLFL(FR) (Pares de íons)	C-18	HIDRÓXIDO DE TETRABUTILAMÔNIO EM ÁGUA
> 2000	INSOLÚVEL EM ÁGUA			CE	GEL DE POLIESTIRENO	THF $CHCl_3$
	SOLÚVEL EM ÁGUA	NÃO IÔNICO		CE	GEL DE DEXTRANO	H_2O CH_3OH
		IÔNICO	BÁSICO	CTI	SP-DEXTRANO	TAMPÃO AQUOSO
			ÁCIDO	CTI	DEAE-DEXTRANO	TAMPÃO AQUOSO

FIGURA IX-2 Esquema para auxiliar na escolha da técnica cromatográfica, em função das características da amostra.

3. CARACTERÍSTICAS DAS FASES MÓVEIS USADAS EM CLAE

As principais características que deve apresentar toda fase móvel para ser útil na CLAE são:

a. Ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação.

b. Dissolver a amostra sem decompor os seus componentes.

c. Não decompor ou dissolver a fase estacionária.

d. Ter baixa viscosidade.

e. Ser compatível com o tipo de detector utilizado.

f. Ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra.

A fase móvel deve ter alta pureza, como um solvente de grau cromatográfico, permitindo realizar análises de alta sensibilidade com detectores por fluorescência ou por absorbância no ultravioleta, onde as impurezas da fase móvel podem absorver e diminuir a sensibilidade do detector para os componentes da amostra. Quando possível, escolher uma fase móvel de fácil purificação que permita a aquisição de solventes com menor grau de pureza e, conseqüentemente, de menor custo.

É importante que a amostra seja solúvel na fase móvel e não sofra decomposição, para que possa ser transportada através da coluna sem que seus componentes se modifiquem. Quando possível, o solvente da amostra é a própria fase móvel ou um dos seus componentes, para que ela não sofra precipitação no injetor ou na coluna, o que provocará queda de resolução na separação.

Quando se utilizar cromatografia líquido-líquido, a fase móvel pode dissolver a fase estacionária. Para evitar isto, satura-se a fase móvel com a fase estacionária através de algum tratamento antes de sua introdução no equipamento ou mediante o uso de uma pré-coluna cheia de algum suporte sólido contendo uma alta percentagem da mesma fase estacionária líquida. Por esta pré-coluna faz-se passar a fase móvel antes dela entrar no injetor e, assim, quem perde a fase estacionária é a pré-coluna.

Colunas com fase estacionária quimicamente ligada ou fase sólida não requerem este tipo de pré-tratamento da fase móvel; somente a filtração é necessária.

A baixa viscosidade da fase móvel é muito importante na eficiência da separação, porque a viscosidade influi no efeito de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel e também na intensidade da vazão.

A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado, o qual é particularmente importante no caso de eluição por gradiente, porque a mudança na composição da fase móvel pode afetar o funcionamento do detector.

Os solventes normalmente empregados, com as suas propriedades mais interessantes para a CLAE, são citados no Apêndice 4.

4. CARACTERÍSTICAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS USADAS EM CLAE

Alumina, celulose, sílica gel e zeolita, que são os materiais usados tradicionalmente na cromatografia líquida clássica, são muito pouco usadas na CLAE porque as suas partículas têm forma irregular, são muito

grandes e dificilmente se consegue reproduzir os resultados da análise devido a facilidade que estes materiais apresentam em mudar as suas propriedades.

Na CLAE os materiais ideais são aqueles que, em menor tempo possível, têm a máxima capacidade de amostra, dão a melhor resolução na separação da mistura, são de fácil introdução na coluna, produzem pequena queda de pressão e que sejam de baixo custo. Estes materiais ideais não existem ainda e, em determinadas circunstâncias, se justifica sacrificar algumas vantagens para se conseguir outras. As dimensões das partículas dos materiais empregados são pequenas e muitas vezes estas partículas têm forma regular que contribui para a uniformidade do enchimento da coluna. Uma outra característica da partícula, que também é importante para a uniformidade, é a de ter uma faixa de variação de diâmetros bem pequena. Alguns destes materiais são completamente porosos e outros peliculares (superficialmente porosos), ambos podendo conter fases quimicamente ligadas a sua superfície.

Considerando as suas propriedades físicas, os recheios para a CLAE podem ser classificados de acordo com os seguintes aspectos:

a. Sólidos rígidos, semi-rígidos ou não rígidos.

b. Partículas porosas ou peliculares.

c. Partículas esféricas ou irregulares.

d. Partículas com diferentes diâmetros.

Sólidos rígidos à base de sílica são os recheios mais usados atualmente. Estes recheios podem resistir a pressões relativamente altas, resultando em enchimento estável e colunas eficientes de partículas pequenas. Estas partículas de sílica podem ser obtidas em vários tamanhos, formas e graus de porosidade. Felizmente, vários grupos funcionais ou camadas poliméricas podem ser ligadas a superfície da sílica, estendendo a utilidade destas partículas para aplicações em alguns métodos indivíduais da CLAE.

Sólidos semi-rígidos são geralmente constituídos de partículas porosas de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno. Dependendo de como eles são preparados, a partícula resultante pode variar em rigidez e porosidade, superando completamente grandes limites. O semi-rígido tem sido usado para pressões até 350 bars, mas algumas destas partículas são limitadas a pressões inferiores a 150 bars. O maior interesse no semi-rígido atualmente é para aplicações na CLAE por exclusão com fase móvel orgânica; contudo eles são também usados na troca iônica.

Sólidos não rígidos, tais como agarose ou dextrose, usados em cromatografia por exclusão clássica, são aplicados exclusivamente para a separação de moléculas grandes, solúveis em água, como as proteínas. Contudo, estes sólidos não rígidos não podem resistir às pressões usadas na CLAE.

Os dois tipos de materiais, peliculares e porosos, diferem em algumas das suas propriedades e têm muitas outras em comum. Ambos podem ser introduzidos na coluna com certa facilidade, obtendo-se colunas muito eficazes. Elas podem ser utilizadas em cromatografia líquido-sólido, dependendo da atividade da sua superfície ou pode ser recoberto com alguma fase líquida para serem utilizadas em cromatografia líquido-líquido. Também, pode-se ligar quimicamente na sua superfície alguma fase líquida e obter-se uma coluna para CLAE com fase quimicamente ligada. Além destes tem-se os materiais de recheio do tipo pelicular ou poroso para cromatografia por troca iônica.

Os adsorventes peliculares, com diâmetros de partícula entre 30 e 45 μm, apresentam eficiência, rapidez, reprodutibilidade e custo similar aos adsorventes completamente porosos, com diâmetros menores, mas apresentam menor capacidade e, por isto, o seu emprego tem diminuído notavelmente nos últimos anos.

Para obter-se uma distribuição homogênea do recheio em toda extensão da coluna, que dará separações com alta eficiência, as partículas devem ter uma faixa de diâmetro a mais estreita possível. As partículas esféricas apresentam melhor facilidade no enchimento, enquanto as irregulares têm menor custo.

O tamanho da partícula também controla o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula. Quanto maior o tamanho da partícula porosa, mais lento será o processo de

difusão e, como conseqüencia, mais lenta será a transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel. Isto acontece porque à medida que aumenta o tamanho da partícula aumenta também a profundidade dos poros (*Figura IX-3a*) e conseqüentemente a amostra demora mais tempo para sair destes poros profundos. Ao mesmo tempo deve-se considerar que um aumento da vazão da fase móvel , para obter-se análises rápidas, faz com que as moléculas da amostra nesta fase migrem rapidamente em comparação com as na fase estacionária (independente dos poros) e isto resulta no alargamento dos picos.

Conforme diminui o tamanho da partícula (Figura IX-*3b*) a profundidade dos poros também diminui e a saída da amostra dos poros acontece mais rapidamente, permitindo obter-se análises rápidas sem perda na eficiência. Estas explicações justificam porque na CLAE utilizam-se somente materiais porosos cujas partículas têm tamanho igual ou menor do que 10 μ m, com exceção da troca iônica.

Outros tipos de materiais utilizados são partículas esféricas, geralmente vítreas, não porosas, recobertas por uma camada muito fina de um adsorvente poroso (Figura IX-*3c*). Este tipo de material é denominado de pelicular de camada porosa, de porosidade superficial ou de centro não poroso.

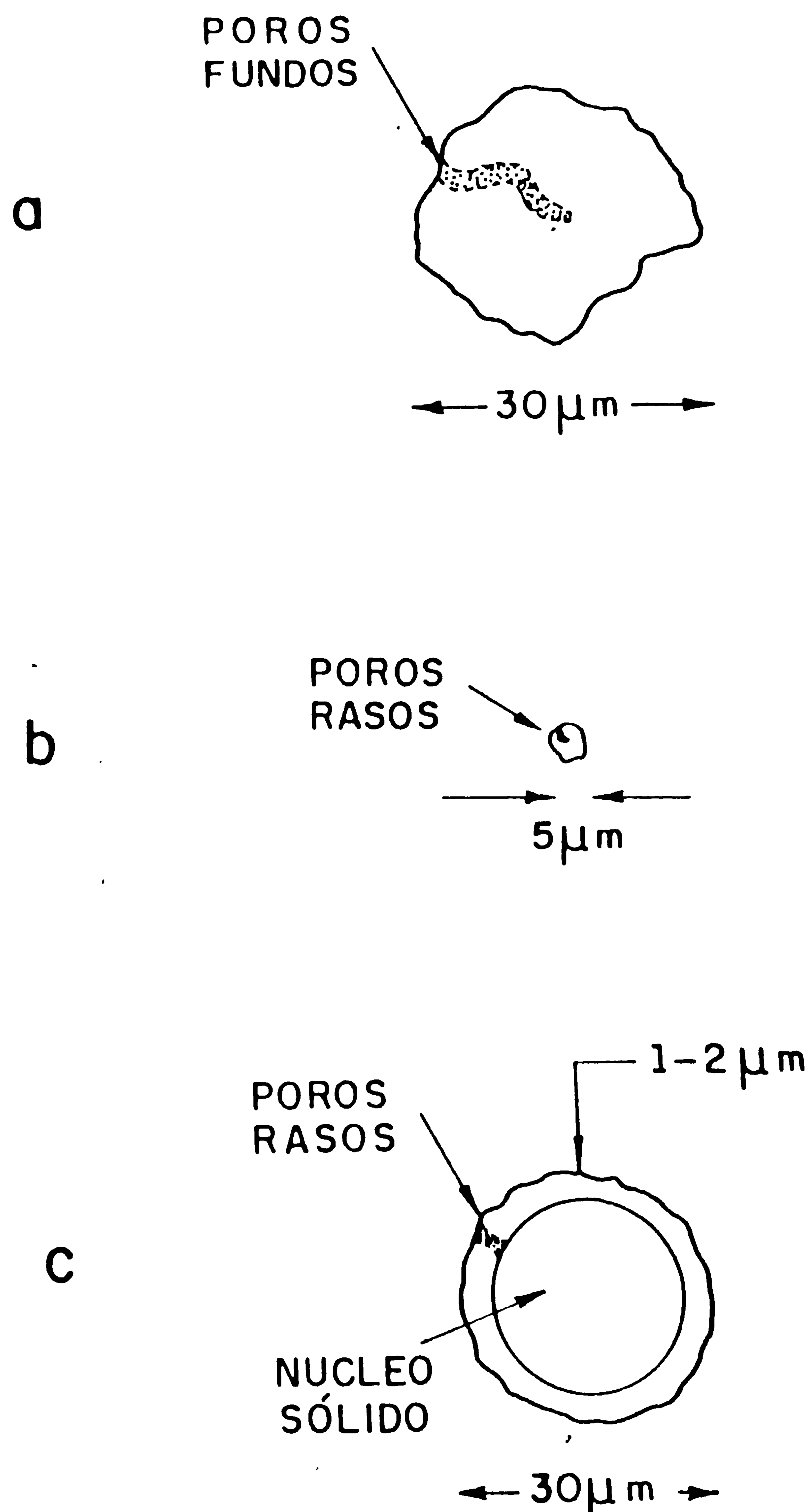



FIGURA IX-3 Tipos de partículas para a CLAE. a: partículas porosas; b: partículas microporosas; c: partículas peliculares.

A *Tabela IX-4* apresenta um resumo das propriedades gerais dos recheios peliculares e porosos em função dos tamanhos de suas partículas.

Tabela IX - 4

Características de diferentes recheios para CLAE

Propriedade	Recheios porosos Irregulares (> 30 μm)	Recheios porosos Esféricos (> 30 μm)	Esféricos ou irregulares (5 ou 10 μm)	Recheios peliculares esféricos (> 30 μm)
Eficiência	baixa a moderada	baixa a moderada	alta	moderada a alta
Velocidade da análise	moderada	moderada	rápida	rápida
Facilidade de enchimento	razoável	boa	razoável	excelente
Quantidade da amostra	grande	grande	grande	pequena
Permeabilidade da coluna	alta	alta	baixa	muito alta
Capacidade	alta	alta	alta	baixa
Custo	baixo	moderado	alto	moderado a alto

Nos parágrafos a seguir serão descritas algumas das fases estacionárias, comumente utilizadas nas diferentes técnicas de CLAE. Além destas, existem outras fases sintetizadas para finalidades específicas, tais como a separação de enantiômeros, carboidratos ou ácidos intermediários do ciclo de Kreb's, para as quais é sugerido consultar os catálogos dos revendedores apropriados ou a literatura especializada.

4.1. Fases estacionárias para CLAE líquido-sólido

Para a maioria das separações realizadas por adsorção (CLS) usa-se partículas totalmente porosas, de 5 μ m ou 10 μ m, além de se empregar, às vezes, os materiais maiores (30-40 μ m), com película porosa. Quase todas estas separações são limitadas a alguns tipos de adsorventes: sílica e alumina. A retenção e a separação nestes adsorventes são geralmente similares, os componentes mais polares da amostra serão retidos preferencialmente. A ordem usual de eluição é: hidrocarbonetos saturados < olefinas < hidrocarbonetos aromáticos ≈ haletos orgânicos < sulfetos < éteres < ésteres ≈ aldeídos ≈ cetonas < álcoois ≈ aminas < amidas < ácidos carboxílicos.

Na modalidade de cromatografia por partição com fase líquida, é preferível usar suportes que sejam inertes; mas não existem suportes inertes com a rigidez e uniformidade requerida pela CLAE. Usa-se a sílica, sabendo-se que tem pontos adsorventes que necessitam ser completamente cobertos ou desativados, como em CG. Os poros deverão ser suficientemente grandes para permitir total acesso das moléculas do soluto à fase estacionária contida dentro da estrutura dos poros, mas suficientemente pequeno para resistir a remoção do líquido estacionário pelo arraste mecânico da fase móvel. Suportes totalmente porosos ou superficialmente porosos podem ser usados para preparação de colunas para CLL.

Na *Tabela IX-5* encontra-se uma lista de alguns sólidos microporosos usados em CLS e como suporte para CLL.

Tabela IX-5

Sólidos microporosos para CLAE líquido-sólido (CLS) e para suporte da CLAE líquido-líquido (CLL) e com fase ligada (CLFL)

Tipo	Nome	Fornecedor	Diâmetro da partícula (μm)	Tamanho do poro (nm)	Volume do poro (mL/g)	Área da superfície (m^2/g)
Sílica (esférica)	ACCUSPHERE-Si	J&W Scientific	3,5	12	0,7	170
			7	30	-	100
	ADSORBOSPHERE-Si	Alltech	3,5,7,10	8	-	200
	ADSORBOSPHERE-HS-Si	Alltech	3,5,10	6	-	350
	AQUAPORE	Brownlee	7	30	-	-
	BAKERBOND-Si	J.T.Baker	3,5	12	-	-
			10	15	-	-
	BAKERBOUND-Si WP	J.T.Baker	5,15	30	-	-
	CHROMEGABOND-Si	E.S.Industries	3,5,10	6	-	500
				8	-	300
				10	-	300
			30	-	-	100
	CHROMSPHERE	ChromPack	5	12	0,7	160
	CP-MICROSPHERE	ChromPack	3	-	-	-
	ECOMOSPHERE-Si	Alltech	3,5,10	8	0,8	200
	HYPERSIL	Shandon	3,5,10	10	-	170
			5,10	30	-	60
	LICHROSPHERE-Si	E.Merck	3,5,10	6	-	400
				10	1,4	250
				30	1,1	60
	MACROSPHERE-Si	Alltech		30	-	90
	NOVAPAK-Si	Waters	4	6	-	-
	NUCLEOSIL	Macherey-Nagel	3,5,7,10	5	0.8	500
				10	1,0	350
				12	0,65	200
				30	1,0	100
	PARTSPHERE-Si	Whatman	3,5,10	12	-	160
	RESOLVE-Si	Waters	5,10	9	-	-
	REXCHROM-Si	Regis	3,5	10	0,5	200
			30	0,8	100	
	SPHERI-Si	Brownlee	5,10	8	-	-
	SPHERISORB	Phase Separations	3,5,10	8	0,3	220
	SPHERISORB-WP	Phase Separations	5,10	30	1,5	190
	ULTRAPORE-Si	Beckman	5	30	-	-
	ULTRASPHERE-Si	Beckman	3,5	8	-	-
	VELOSEP-Si	Brownlee	3	10	-	-
	VYDAC HS-101	Separations group	5,10	8	0,8	500
	VYDAC TP-101	Separations Group	5,10	30	0,6	100
	ZORBAX-SIL	DuPont	7	7	-	300
			5,10	33	-	100
Sílica (irregular)	BIO-SIL HP	BioRad	10	6	-	350
	ECONOSIL	Alltech	5,10	6	-	450
	LICHROSORB-Si	E.Merck	5,7,10	4	0,6	800
				6	0,7	500
				10	1,0	300
	POLYGOSIL	Macherey-Nagel	5,10	6	-	500
	PARTISIL-Si	Whatman	5,10	8,5	-	350
	μ-PORASIL	Waters	10	6	-	300
				12,5	-	300
	PROTESIL	Whatman	5,10	30	-	250
	RSIL	Alltech	5,10	8	-	550
	ULTRASIL	Beckman	10	8	-	-
	VERSAPACK	Alltech	10	8	-	200
Alumina esférica	SPHERISORB AY	Phase Separations	5,10	13	-	93
Alumina (irregular)	ALOX 60D	Macherey-Nagel	5,10	6	-	60
	LICHROSORB ALOX-T	E.Merck	5,10	15	-	70
Carbono Grafitizado	HYPERCARB	Shandon	7	25	-	150
Polímero de estireno-divinil benzeno	PLRP-S	Polymer Laboratories	5,8,10	10	-	500
	POLYSPHERE	E.Merck	10	8	-	-
	PRP-1	Hamilton	5,10	7,5	-	445
	ROGEL RP	Alltech	5,8	7	-	-
Polímero de vinilpridina	MACROPHASE MP-2	Interaction	-	-	-	-
	POLYSPHERE RPCI	E.Merck	-	-	-	-
Polímero de propilamida-6	PERISORB PA-6	E.Merck	-	-	-	

Alguns exemplos de adsorventes peliculares são encontrados na *Tabela IX-6.* Diz-se que estes materiais são de baixa capacidade de amostra, geralmente da ordem de microgramas por grama (μg por g) de adsorvente, mas, pela sua alta eficiência, análises muito rápidas são possíveis de serem realizadas. Todos os peliculares têm forma esférica e os mais comuns são os que apresentam uma camada de sílica gel sobre a superfície da esfera dura.

Tabela IX-6

Sólidos peliculares para CLAE líquido-sólido (CLS) e para suporte da CLAE líquido-líquido (CLL) e com fase ligada (CLFL)

Tipo	Nome	Fornecedor	Diâmetro da partícula (μm)	Tamanho do poro (nm)	Volume do poro (mL/g)	Área de Superfície (m^2/g)
Sílica (ativa)	CORASIL I	Waters	37-50	-	-	7
	CORASILII	Waters	37-50	-	-	14
	PELLOSIL HS	Whatman	37-44	-	-	4
	PELLOSIL HC	Whatman	37-44	-	-	8
	PERISORB A	E.Merck	30-40	6	0,05	14
	SYNCHROPAK SC	SynChrom	30-40	-	-	-
	VYDAC-SC-101	Separations Group	30-40	6	-	10
Sílica (inativa)	ZIPAK	DuPont	26-37	-	-	1
Alumina	PELLUMINA HS	Whatman	37-44	-	-	4
	PELLUMINA HC	Whatman	37-44	-	-	8

Alguns sólidos têm uma superfície muito pouco ativa e só são úteis como suporte para CLL, como é o caso do Zipac. Outros, como Corasil, Pellosil, Vydac, etc., são utilizados tanto para CLL como para CLS.

Todos estes adsorventes normalmente contêm uma certa porcentagem mínima de uma fase líquida com o propósito de desativar os sítios mais ativos de sua superfície. No caso da CLS deposita-se uma certa percentagem de água (aproximadamente 0,02 a 0,04 g de água por cada 100 m^2 de superfície), a qual é suficiente para desativar parcialmente o adsorvente e aumentar a faixa linear da fase.

4.2. Fases estacionárias para CLAE com fase ligada

A superfície de sílica, que é o suporte mais popular, pode ser modificada por um destes caminhos, entre outros:

a. Formação do éster silicato (Si-O-R) por reação do grupo silanol com um álcool:

$$\text{Si-OH} + \text{ROH} \longrightarrow \text{Si-O-R} + H_2O$$

b. Formação da ligação siloxano (Si-O-SiR) por reação do grupo silanol com um organoclorossilano:

$$\text{Si-0H} + R_3\text{SiCl} \longrightarrow \text{Si-O-SiR}_3 + \text{HCl}$$

c. Formação da ligação silício-carbono pelo tratamento do grupo silanol com cloreto de tionila, para produzir o cloreto, que, em seguida, reage com um composto organometálico para produzir um grupo orgânico ligado diretamente a superfície da sílica:

$$\text{Si-OH} + \text{SOCl}_2 \longrightarrow \text{Si-Cl} + \text{HCl} + SO_2$$

$$\text{Si-Cl} + \text{RLi} \longrightarrow \text{Si-R} + \text{LiCl}$$

Estes materiais, quando preparados pelos métodos b e c têm, relativamente, uma grande estabilidade (até pH = 8). O tipo éster, preparado pelo método "a" já não é tão estável.

Tabela IX-7

Fases estacionárias microporosas para CLAE com fase ligada (CLFL)

Tipo	Nome	Fornecedor	Grupo ligado	% de carbono (em peso)
Apolar	ACCUSPHERE ODS I	J & W Scientific	octadecil-polímero	10,0
	ODS II		octadecil-monômero	10,5
	methyl		trimetil	2,6
	ADSOBOSPHERE C18	Alltech	octadecil	12,0
	HS-C18		octadecil	20,0
	C8		octil	8,0
	AQUAPORE RP300	Brownlee	octil	
	BAKERBOND C18	J.T.Baker	octadecil	
	C8		octil	
	C4		butil	
	μBONDAPAK-C18	Waters	octadecil	10,0
	CHROMEGABOND C22	E.S.Industries	docosil	
	C18		octadecil-polímero	
	MC18		octadecil-monômero	
	C12		dodecil	
	C8		octil-polímero	
	MC8		octil-monômero	
	MCC6		ciclohexil-monômero	
	C6		hexil-polímero	
	TMS		trimetil-polímero	
	C2M		dimetil	
	C2		etil	
	C1		metil	
	CHROMOSPHERE C18	Chrom Pack	octadecil	
	C8		octil	
	ECONOSIL C18	Alltech	octadecil	15,0
	C8		octil	10,0
	HYPERSIL ODS	Shandon	octadecil	10,0
	MOS-1		octil	7,0
	MOS-2		octil	
	MOS-WP		octil	2,7
	SAS		metil	2,6
	LICHROSORB RP18	E.Merck	octadecil	15,0
	RP8		octil	9,0
	RP2		metil	
	NOVAPAK C18	Waters	octadecil	7,0
	NUCLEOSIL-100-C18	Macherey-Nagel	octadecil	14,0
	120-C18		octadecil	11,0
	100-C8		octil	9,0
	120-C8		octil	7,0
	PARTISIL ODS-1	Whatman	octadecil-polímero	5,0
	ODS-2		octadecil-polímero	15,0
	ODS-3		octadecil-polímero	10,5
	C8		octil	9,0
	PARTISPHERE C18	Whatman	octadecilmonômero	10,0
	C8		octil	6,0
	RESOLVE C18	Waters	octadecil	12,0
	C8		octil	6,0
	REXCHROM ODS	Regis	octadecil	
	octyl		octil	
	butyl		butil	
	RSIL C18 HL	Alltech	octadecil	16,0
	C8		octil	9,0
	C3		metil	7,0
	SPHERI-5 RP18	Brownlee	octadecil-monômero	
	ODS		octadecil-polímero	
	RP8		octil-monômero	
	OSS		octil-polímero	
	RP2		dimetil	
	SPHERISORB ODS-I	Phase Separations	octadecil-polímero	7,0
	ODS-II		octadecil-monômero	12,0

octadecil-monômero

Tabela IX-7

Fases estacionárias microporosas para CLAE com fase ligada (CLFL)

Tipo	Nome	Fornecedor	Grupo ligado	% de carbono (em peso)
	C8		octil-monômero	6,0
	C6		hexil	6,0
	C1		metil	2,0
	ULTRACARB C18	Phenomenex	octadecil	22,0
	ODS		octadecil	31,0
	VYDAC 201 TP	Separations	octadecil	9,0
	201 HS	Group	octadecil	13,5
	218 TP		octadecil	8,0
	228 TP		octil	
	214 TP		butil	4,0
	ZORBAX-ODS	DuPont	octadecil	18,0
	C8		octil	15,0
Polaridade média	ACCUSPHERE CN	J & W Scientific	cianopropil	4,0
	PHENYL		fenil	3,0
	ADSORBOSPHERE CN	Alltech	cianopropil	
	PHENYL		fenil	
	μ-BONDAPAK CN	Waters	cianopropil	6,0
	PHENYL		fenil	8,8
	CHROMEGABOND AP	E.S.Industries	alquifenil	
	CN		cianopropil	
	DNAP		dinitroanilioropil	
	DP		difenil	
	FE		fluoro eter	
	FD		fluorodecil	
	FP		fluoropropil	
	PFP		fluorofenil	
	PU		fenetilurea	
	HYPERSIL CPS	Shandon	cianopropil	4,0
	PHENYL		fenil	5,0
	LICHROSORB CN	E.Merck	cianopropil	
	NOVOPAK CN	Waters	cianopropil	3,0
	PHENYL		fenil	4,0
	NUCLEOSIL 100-CN	Macherey-Nagel	cianopropil	
	100-$N(CH_3)_2$	dimetilamino	dimetilamino	
	100-NO_2		nitroalquil	
	REXCHROM PHENYL	Regis	fenil	
	SPHERISORB CN	Phase	cianopropil	3,5
	PHENYL	Separations	fenil	3,0
	VYDAK 219 TP	Separations Group	difenil	3,0
	ZORBAX-CN	DuPont	cianopropil	
Polaridade alta	ACCUSPHERE-AMINO	J & W Scientific	propilamina	2,2
	-DIOL		propidiol	2,5
	ADSORBOSPHERE-NH_2	Alltech	alquilamina	
	-PAC		ciano + amina	
	BAKERBOND-DIOL	J.T.Baker	alquildiol	
	-NH_2		alquilamina	
	CHROMEGABOND-A	E.S.Industries	alquilamina	
	NCN		ciano + amina	
	D		alquildiol	
	DA		diamina	
	TA		triamina	
	HYPERSIL-APS	Shandon	alquilamina	2,0
	LICHROSORB-DIOL	E.Merckalquildiol		
	-NH_2		alquilamina	
	NUCLEOSIL-100-DIOL	Macherey-Nagel	alquildiol	
	-100-NH_2		alquilamina	
	PARTISIL-PAC	Whatman	ciano + diamina	
	SPHERISORB-NH_2	Phase Separations	propilamina	2,0
	ZORBAX-NH_2	DuPont	alquilamina	

A *Tabela IX-7* cita alguns materiais para CLFL utilizados normalmente em CLAE. Todas as fases quimicamente ligadas são baseadas em núcleo que é um dos sólidos da *Tabela IX-5*. O seu nome é o mesmo da *Tabela IX-5*, com poucas exceções (por ex., Bondapak vs Porasil), mais algumas especificações para identificar o grupo funcional. Então, nesta tabela, não há necessidade de incluir o tamanho da partícula, porque já foi citado na *Tabela IX-5. Em substituição, foi colocada a porcentagem de carbono no total de massa (que é uma medida do grau de cobertura). A maioria deles contêm a ligação Si-O-SiRR'*$_2$, onde R é o grupo quimicamente ligado, ativo na separação e R' é, normalmente, grupo metil. Alguns destes materiais têm diferentes percentagens de fase quimicamente ligada com o mesmo nome, por ex., Partisil ODS-X, onde X = 1, 2 ou 3 corresponde a 5, 15 e 10% de carbono ligado ao Partisil, respectivamente. Esta percentagem de fase quimicamente ligada é que vai limitar a quantidade de amostra que poderá ser utilizada na separação.

Outro parâmetro importante, especialmente para as fases ligadas apolares, é se os grupos silanóis que sobraram, após a reação de preparação da fase estacionária, foram, ou não, desativados por reações de capeamento ("end capping") com trimetilmetoxissilano ou reagente similar.

Dos materiais citados na *Tabela IX-7*, os mais utilizados são os da cromatografia com fase reversa, que têm os grupos octadecil, octil e dimetil, entre outros. São também amplamente utilizados os grupos amino e nitrilo, que produzem fases estacionárias de caráter polar.

Na *Tabela IX-8* são citados alguns dos materiais normalmente usados para CLFL, baseados nas partículas peliculares.

Tabela IX-8

Fases estacionárias peliculares para CLAE com fase ligada (CLFL)

Tipo	Nome	Fornecedor	Grupo ligado
Apolar	BONDAPAK C18	Waters	octadecil
	CO:PELL-ODS	Whatman	octadecil
	PERISORB RP18	E.Merck	octadecil
	RP8		octil
	RP2		metil
	PERMAPHASE ODS	DuPont	octedecil
	SYNCHROPAK-RSC-C18	SynChrom	octadecil
	RSC-C8		octil
	RSC-C4		butil
	RSC-C1		metil
	VYDAC SC-201	Separations Group	octadecil
	ZIPAC-HC	DuPont	hidrocarboneto
Polaridade média	BONDAPAK PHENYL	Waters	fenil
	PERMAPHASE ETH	DuPont	éter
	VYDAC SC-501	Separations Group	alquilnitrila
	ZIPAC ANH	DuPont	alquilnitrila
Polaridade alta	CO:PELL-PAC	Whatman	aminonitrila
	PERISORB PA-6	E.Merck	poliamida
	VYDAC SC-601	Separations Group	alquilamina
	ZIPAC PAM	DuPont	poliamida

4.3. Fases estacionárias para CLAE por troca iônica

Os materiais usados como recheio para a CLAE por troca iônica (CTI) têm grupos (cátions ou ânions) quimicamente ligados a partículas porosas de resinas poliméricas, a sílica com camada pelicular, as micropartículas porosas de sílica e as micropartículas porosas de resinas poliméricas.

Tradicionalmente, as partículas porosas de resina polimérica são usadas na separação de aminoácidos, peptídeos e carboidratos. Este material consiste em partículas rígidas do copolímero poliestireno-divinilbenzeno, cuja superfície e poros contêm os grupos trocadores de íons. Estes materiais são de capacidade elevada, geralmente da ordem de miliequivalente por grama de material e são encontrados com diâmetros maiores (30-40 μ m) ou menores (5 μ m, 10 μ m).

As sílicas com camadas peliculiares consistem de uma partícula vítrea de forma esférica recoberta com uma camada fina do copolímero poliestireno-divinilbenzeno que contém os grupos ativos trocadores de íons. Estes materiais são de capacidade reduzida, da ordem de 10 μ g/g, mas muito eficazes.

A maioria destas sílicas com camadas peliculares podem ser utilizadas com solventes orgânicos.

Existem também materiais que têm a vantagem de resistir a pressões elevadas e possuir uma capacidade de troca superior a dos materiais peliculares; são as micropartículas porosas de sílica com grupos trocadores quimicamente ligados.

Os grupos quimicamente ligados, presentes em todo tipo de material de troca iônica, são:

$-SO_3^-$ - trocadores fortes de cátions.

$-CO_2^-$ - trocadores fracos de cátions.

$-NR_3^+$ - trocadores fortes de ânions.

$-NH_2R^+$ - trocadores fracos de ânions.

As catiônicas são adquiridas comercialmente na forma de sais de sódio (Na^+) ou de íon hidrônio (H^+) e as aniônicas na forma de cloreto (Cl^-).

Na *Tabela IX-9* destacam-se as características mais importantes de alguns materiais empregados como fase estacionária na CLAE por troca aniônica e catiônica. As capacidades indicadas na *Tabela IX-9* são aproximadas, porque o valor verdadeiro depende da amostra.

Sendo que os processos de troca iônica dependem muito da temperatura, é conveniente ter algum sistema de controle térmico quando for empregada este tipo de fase estacionária, pois mudanças normais na temperatura ambiente podem afetar os resultados.

4.4. Fases estacionárias para CLAE por exclusão

A cromatografia por exclusão tem a sua resolução baseada no tamanho efetivo das moléculas dos componentes da amostra em solução.

Como está indicado no Capítulo VI, existem limites que determinam o intervalo de tamanhos em que um material é útil. O primeiro é um inferior, chamado limite de permeação, abaixo do qual todas as moléculas de menor tamanho são igualmente difundidas dentro dos poros do material e o segundo é um superior, limite de exclusão, acima do qual todas as moléculas são muito grandes para penetrar nos poros. Moléculas de tamanho intermediário entre ambos limites serão separadas totalmente ou parcialmente de acordo com a seletividade característica de cada material. Então, serão eluídas da coluna sem resolução as moléculas menores que o limite de permeação e as maiores do que o limite de exclusão, separando somente as que se encontram dentro destes limites.

Atualmente dispõe-se de um grande número de materiais para a cromatografia por exclusão. Eles variam de acordo com a sua rigidez e com o intervalo de tamanho dentro do qual são úteis, isto é, o material a ser utilizado na coluna dependerá do tamanho efetivo das moléculas que devem ser separadas.

Quanto a rigidez existem três tipos de materiais. Os primeiros são os materiais fracos (não rígidos), constituídos de géis de polidextrano (Sephadex), poliacrilamidas (Bio-Gel P) e poliagaroses (Sepharose e

Tabela IX-9

Fases estacionárioas para CLAE por troca iônica (CTI)

Tipo	Nome	Fornecedor	Suporte	Grupo funcional	Capacidade (meq/g)
Aniônico	ADSORBOSPHERESAX	Alltech	sílica	$-NR_3^+$	
	AMINEX A SERIES	Bio-Rad	es-dvb*	$-NR_3^+$	3,2
	AQUAPORE AX-300	Brownlee	sílica	$-NR_3^+$	
	BAKERBOND N^+ DIAMINO	J.T.Baker	sílica	$-NR_3^+$	
				$-NR_2$	
	ION-100 AX	Interaction	es-dvb	$-NR_3^+$	
	IONPAC-AS	Dionex	polímero	$-NR_3^+$	
	NUCLEOSIL 100-SB	Macherey-Nagel	sílica	$-NR_3^+$	1,0
	PARTISIL SAX	Whatman	sílica	$-NR_3^+$	<1
	PARTISPHERE SAX	Whatman	sílica	$-NR_3^+$	<1
	WAX			DEAE	
	POLYPORE ANION	Brownlee	es-dvb	$-NR_3^+$	
	POLYSPHERE SAW	E.Merck	es-dvb	$-NR_3^+$	
	PRP-100	Hamilton	es-dvb	$-NR_3^+$	0,2
	SPHERISORB SAX	Phase Separations	sílica	$-NR_3^+$	0,4
	VYDAC 300-IC	Separations Group	sílica	$-NR_2$	
	301-TP			$-NR_3^+$	1,0
	302-IC			$-NR_2$	
	ZORBAX SAX	Dupont	sílica	$-NR_3^+$	
Catiônico	ADSORBOSPHERE-SCX	Alltech	sílica	$-SO_3^-$	
	AMINEX A series	Bio-Rad	es-dvb	$-\phi SO_3^-$	5,0
	AQUAPORE CX-300	Brownlee	sílica	$-SO_3^-$	
	BAKERBOND ASA	J.T.Baker	sílica	$-\phi SO_3^-$	
	PCA			-RCOOH	
	PSA			$-R-SO_3^-$	
	CHROMEGABOND	E.S.			
	A-SCX	Industries	sílica	$-R-SO_3^-$	
	A-WCX			-RCOOH	
	P-SCX			$-\phi SO_3^-$	
	P-WCX			$-\phi$COOH	
	ION-200	Interaction	es-dvb	SO_3^-	
	IONPAC CS	Dionex	polímero	SO_3^-	
	LICHROSORB KAT	E.Merck	sílica	SO_3^-	1,2
	NUCLEOSIL 100SA	Macherey-Nagel	sílica	$-\phi-SO_3^-$	1,0
	PARTISIL SCX	Whatman	sílica	$-\phi-SO_3^-$	1,0
	PARTISPHERE SCX	Whatman	sílica	$-\phi-SO_3^-$	
	WCX		sílica	$-\phi-COO^-$	
	POLYPORE H	Brownlee	es-dvb	$-SO_3^-$	
	POLYSORB MP-3	Interaction	es-dvb	$C18 + RSO_3^-$	
	POLYSPHERE ICN	E.Merck	es-dvb	$-COO^-$	
	IIC		es-dvb	$-SO_3^-$	
	PRP-200	Hamilton	es-dvb	$-SO_3^-$	0,35
	VYDAC 400 IC	Separations Group	sílica	$-COO^-$	
	401 TP			$-SO_3^-$	1,0

* es-dvb: copolímero de estireno e divinilbenzeno

Bio-Gel A), usados quase sempre com fases móveis aquosas. Sua capacidade é elevada mas eles não resistem a pressões superiores a 3 bars; então, são usados somente na CE clássica.

Os segundos são os materiais semi-rígidos que normalmente resistem a pressões da ordem de 100 a 150 bars. Estes materiais são constituídos de microesferas de algum copolímero, como o poliestireno-divinilbenzeno. Podem ser empregados com fases móveis aquosas ou não aquosas e existem em uma grande variedade de porosidade. São usados em CLAE e também em CE clássica.

Os terceiros são os materiais rígidos que resistem a qualquer pressão e são geralmente constituídos de partículas de sílica porosa ou de vidro poroso. Devido à sua rigidez podem-se obter separações muito rápidas com fluxo da fase móvel muito alto, que produz pressões elevadas, para uso em CLAE.

Os materiais à base de sílica ou vidro podem ter a superfície muito ativa e apresentar adsorção ou degradação de certos materiais (por exemplo, desnaturação de proteínas). Existem tratamentos para eliminar estes efeitos mediante processos de desativação química, tais como silanizar a sua superfície de modo muito similar ao tratamento químico dos suportes em cromatografia gasosa.

Na Tabela IX-10 são mencionados alguns destes materiais de recheio para colunas de CLAE.

Tabela IX-10

Fases estacionárias microporosas para CLAE por exclusão (CE)

Nome	Fornecedor	Material	Diâmetro da partícula (ønm)	Faixa de molecular	n° etapas	Fase* móvel
BIOGEL SEC	BioRad	es-dvb**	10	10^3-$8x10^6$	7	aq
BIOSIL SEC	BioRad	sílica	10	500-10^6	3	aq/org
µ-BONDAGEL	Waters	sílica	10	$2x10^3$-$7x10^6$	4	aq/org
CHROMEGA-BOND ME	E.S. Industries	sílica	10	10^2-10^7	6	aq/org
IONPAK-S	Showa Denka	es-dvb	-	10^2-$5x10^7$	6	aq
MACROSPHERE GPC	Alltech	sílica	7	10^2-$7x10^5$	7	aq
MICROGEL GPC	ChromPack	es-dvb	5,10	10^2-$4x10^7$	7	org
OHPAK-B	Showa Denko	poliglicerol-metacrilato	-	10^4-10^7	4	ag
OHPAK-Q	Showa Denko	polivinil álcool	-	500-5000	2	aq
PHENOGEL	Phenomenex	es-dvb	10	10^2-10^8	7	org
PL AQUAGEL	Polimer Laboratories	poliacrilamida	10	10^2-10^5	2	aq
PL GEL	Polymer Laboratories	es-dvb	5,10	10^2-$4x10^6$	6	org
ROGEL-P SEC	Alltech	es-dvb	5	10^2-$6x10^5$	3	aq
SHODEX A	Showa Denko	es-dvb	10	10^2-$2x10^8$	8	org
SHODEX KF	Showa Denko	es-dvb	5	10^2-$4x10^7$	7	org
SOTAPHASE GF	Sota Chromatography	sílica	10	$5x10^3$-$7x10^5$	1	aq
µ-SPHEROGEL	Beckman	sílica	10	10^2-$4x10^7$	7	org
µSTYRAGEL	Waters	es-dvb	10	10^2-10^7	6	org
SYNCHROPAK GPC	SynChrom	sílica	5,10	10^2-10^7	6	aq/org
TSK-GEL PW	TosoHaas	polieter	10	10^2-10^7	6	aq
TKS-GEL SW	TosoHaas	sílica	10	500-$5x10^5$	3	aq
ULTRAHYDRAGEL	Waters	polimetacrilato	10	$2x10^3$-$7x10^6$	5	aq
ULTRASTYRAGEL	Waters	es-dvb	<10	10^2-10^7	6	org
W-POREX	Phenomenex	sílica	10	10^3-$4x10^5$	2	org

*aq = soluções aquosas tamponadas; org = soluções não aquosas

**es-dvb = copolímero de estireno e divinilbenzeno

5. CARACTERÍSTICAS DAS COLUNAS USADAS EM CLAE

As colunas são constituídas de um pedaço de tubo de algum material inerte, de diâmetro interno uniforme e capaz de resistir às pressões em que será usado. O aço inoxidável é o mais usado entre todos os materiais. Existem também algumas feitas com vidro de paredes grossas, mas apresentam o inconveniente de não se conseguir conecções adequadas, entre o vidro e o metal, que resistam a altas pressões sem vazamento.

A superfície das paredes internas do tubo exerce certa influência sobre a eficiência da coluna, que requer tubos de diâmetro interno muito preciso e, se for de metal, paredes finamente polidas.

Geralmente, o diâmetro interno das colunas para fins analíticos é ao redor de 3 a 5 mm e para colunas preparativas igual ou maior do que 10 mm. As colunas com microdiâmetro apresentam diâmetros internos entre 0,05 e 2 mm. O comprimento fica entre 10 e 50 cm, com exceção da cromatografia por exclusão onde às vezes usam-se colunas de comprimento maior ou várias colunas conectadas uma na outra.

A capacidade da coluna é determinada pelo seu comprimento, diâmetro e material de recheio. Quando se usam colunas de menor comprimento, que efetuam análises muito rápidas, devem ser de alta eficiência. Por outro lado a sua capacidade é muito limitada e conseqüentemente a quantidade de amostra deve ser pequena, o que exige um detector muito sensível.

Quando se quer separar e recuperar os componentes de uma amostra em quantidade suficiente para depois serem utilizados, isto é, separação do tipo preparativa, deve-se utilizar colunas com material de maior capacidade. Um inconveniente deste tipo de coluna preparativa é que a separação é mais demorada e apresenta uma eficiência menor que a coluna analítica.

As colunas são normalmente retas porque apresentam uma perda na eficiência quando são dobradas. Por isso quando é necessário usar colunas compridas, utilizam-se colunas retas conectadas entre si com tubo de comprimento e diâmetro interno o menor possível, sem recheio, ou colunas com forma de "8", "S", ou "U" com curvatura grande. Estas últimas configurações facilitam o uso de um forno para controle de temperatura. Deve-se lembrar que qualquer estrangulamento da coluna provocará uma grande perda da eficiência.

Nos extremos da coluna coloca-se um disco de teflon ou metal poroso para evitar a perda do recheio ou mudanças na sua compactação. É importante que este disco retenha as partículas do recheio sem produzir um aumento muito grande na pressão.

Nas colunas atuais é comum obter-se eficiência da ordem de 60.000 pratos teóricos por metro de coluna, que é superior às eficiências normalmente obtidas em cromatografia gasosa com colunas recheadas.

Os grandes avanços obtidos na tecnologia das colunas são devido à uniformidade dos tamanhos das partículas, à obtenção de micropartículas (3 ou 5 μm), à melhor eficiência nos processos químicos de preparação de materiais de fase estacionária quimicamente ligada e ao desenvolvimento de processos eficientes de enchimento das colunas.

5.1. Técnicas de enchimento das colunas

O enchimento de colunas para CLAE pode ser feito a seco ou usando uma suspensão da fase estacionária em um solvente apropriado.

Sendo que as pequenas partículas, durante o enchimento a seco com vibração, tendem a formar aglomerados, produzindo um acúmulo das partículas maiores perto da parede e das menores no centro da coluna, o método de enchimento por suspensão é preferido para rechear colunas com partículas de diâmetro menor do que 30 μ m.

5.1.1. Enchimento por vibração, a seco, para sólidos rígidos

Um procedimento ideal para este tipo de enchimento é o seguinte:

a. Desengordurar a parede interna da coluna por lavagem com diclorometano, acetona e água sucessivamente.

b. Esfregar o interior do tubo da coluna com solução de detergente quente, lavar bem com água e metanol e secar.

c. Colocar o filtro poroso em uma extremidade da coluna e colocá-la na posição vertical de maneira que o filtro fique na extremidade inferior.

d. Adicionar pequenas porções do recheio na coluna, de cada vez, através de um funil, suficiente para encher 3-6 mm da coluna.

e. Bater de leve a coluna sobre um banco de madeira, duas vezes por segundo, aproximadamente 100 vezes. Pode-se também substituir esta compactação manual por uma automática através de um vibrador mecânico.

f. Girando a coluna, bater fracamente nos lados na altura em que estiver o nível do recheio.

g. Bater verticamente a coluna no banco durante 15 segundos.

h. Adicionar nova porção do recheio e repetir as etapas e, f e g.

i. Quando a coluna estiver cheia, continue batendo fracamente por aproximadamente 3 minutos.

j. Limpar o fim do tubo e colocar o outro filtro poroso.

5.1.2. Enchimento por suspensão com alta pressão

Neste método, a primeira etapa é a escolha do solvente ou da mistura de solventes para ter a sua densidade aproximadamente igual a densidade da partícula, para que esta permaneça em suspensão durante o período de enchimento. Solventes mais viscosos produzem uma suspensão com maior período de duração, mas, também, exigem maior pressão na hora do enchimento. Os valores de densidade e viscosidade para os solventes mais utilizados nesta técnica encontram-se na *Tabela IX-11.*

Existem vários aparelhos à disposição no comércio para serem utilizados neste método de enchimento. Sempre existem algumas diferenças entre as técnicas utilizadas por eles, mas de uma maneira geral as etapas envolvidas neste processo são:

a. Degasificar o solvente escolhido, por aquecimento e agitação ou por ultra-som.

b. Colocar o recheio (15% a mais do que o necessário para encher a coluna) em um pequeno frasco de vidro. Adicionar a quantidade necessária de solvente e submeter a agitação (em banho de ultra-som ou magnético) para formar a suspensão.

c. Preparar a coluna seguindo os itens a, b e c do enchimento a seco.

d. Colocar a suspensão no reservatório apropriado.

e. Conectar a coluna ao reservatório.

f. Aplicar a pressão necessária durante o período requerido (normalmente 5 minutos) através da bomba de alta pressão que deslocará a suspensão para a coluna.
g. Desligar a bomba. Quando a vazão de solvente parar, a coluna pode ser desconectada.
h. Limpar a extremidade da coluna.
i. Colocar o outro filtro e fechar as duas extremidades.

Tabela IX-11

Propriedades dos solventes utilizados no enchimento por suspensão

Solvente	Densidade (g/mL)	Viscosidade (mPa.s a 20°C)
n-heptano	0,7	0,41
metanol	0,8	0,60
ciclohexano	0,8	1,0
etanol	0,8	1,2
n-propanol	0,8	2,3
n-butanol	0,8	2,9
diclorometano	1,3	0,43
bromoetano	1,5	0,40
clorofórmio	1,5	0,58
tetracloreto de carbono	1,6	0,97
tetracloroetileno	1,6	0,9
iodometano	2,3	0,50
dibrometano	2,5	1,0
diiodometano	3,3	2,9

5.2. Cuidados com as colunas da CLAE

No emprego das colunas de partículas microporosas são necessárias algumas precauções.

Se a coluna é usada com amostras muito sujas, é melhor protegê-la com uma pré-coluna. A pré-coluna é uma coluna pequena com o mesmo recheio ou similar da camada porosa usada na coluna, colocada entre o injetor e a coluna.

As pré-colunas com esta finalidade geralmente são de 2-5 cm de comprimento com o mesmo diâmetro interno da própria coluna, para que apresentem as mesmas características de separação. Elas devem ser renovadas depois de um certo número de injeções.

Devido a grandes volumes de solventes que são bombeados através da coluna, eles devem ter um alto grau de pureza para evitar a contaminação da coluna. Mesmo quando for adquirido solventes com um grau de pureza de nível para cromatografia ou espectrofotometria, deve-se testar este grau de pureza e, quando necessário, deve-se procurar métodos de purificação. Um outro cuidado importante é que os solventes devem ser filtrados, em filtros 2 a 5μm, para retirar partículas sólidas, que podem riscar o pistão ou a válvula injetora ou mesmo entupir os tubos do sistema.

Alguns solventes contendo impurezas que são muito polares irão interferir no seu emprego como fase móvel, na maioria das aplicações da CLAE. Por exemplo, o clorofórmio pode ter sido estabilizado com uma pequena quantidade de metanol. Se o solvente é imiscível com a água (por exemplo, clorofórmio), uma simples extração com água e secagem com sulfato de sódio anidro pode retirar a impureza polar.

Solventes halogenados podem conter traços de HCl, HBr, etc., que podem reagir com o aço inoxidável da coluna e outras partes do sistema. Dependendo da natureza potencialmente corrosiva de cada solvente, eles podem também trazer problemas para a coluna, com a solubilização de íons metálicos.

6. EQUIPAMENTO PARA CLAE

O equipamento da CLAE é muito mais sofisticado do que a CLC. Sem dúvida é possível obter instrumentos que podem ser considerados bastante refinados. Existe uma ampla quantidade deles com diferença em custo, versatilidade e complexidade.

Certas características de índole geral devem ser avaliadas, ao considerar um certo instrumento para fins de aquisição ou para ter uma noção sobre a utilidade a que se pode prestar.

As principais destas características são:

a. Versatilidade - O equipamento deve ser útil para resolver amostras de diferentes tipos, servir às distintas técnicas cromatográficas e, quando possível, realizar o máximo de operações, tais como, programação de gradiente da fase móvel, coleção das frações, reciclagem de frações, etc., necessárias às análises sofisticadas.

b. Rapidez - Para se conseguir análises tão rápidas quanto possível, deve-se obter as melhores condições da CLAE: fase móvel de baixa viscosidade usada com bomba de alta pressão e colunas com partículas de pequeno diâmetro (grande área de superfície que ajuda os processos de separação).

c. Reprodutibilidade e Estabilidade - São características essenciais quando se quer obter do equipamento um bom funcionamento a longo prazo. O equipamento deve ter um controle adequado sobre os parâmetros de operação, tais como vazão, temperatura, pressão e composição da fase móvel, e, para isto, deve estar provido de controles de temperatura e vazão.

d. Sensibilidade - Um bom equipamento, mesmo trabalhando com pequenas quantidades de amostra, deve gerar sinais de intensidade apreciável. A sensibilidade na CLAE depende, sobretudo, do sistema de detecção utilizado. Com os detectores produzidos recentemente é possível detectar componentes de um amostra na faixa de nanograma ou menos.

Um estudo detalhado das características citadas permitirá escolher um instrumento que melhor se adapte ao tipo de trabalho que se quer efetuar.

A *Figura IX-4* mostra um esquema de um cromatógrafo básico para CLAE cujos componentes, bem como outros não ilustrados, são descritos a seguir.

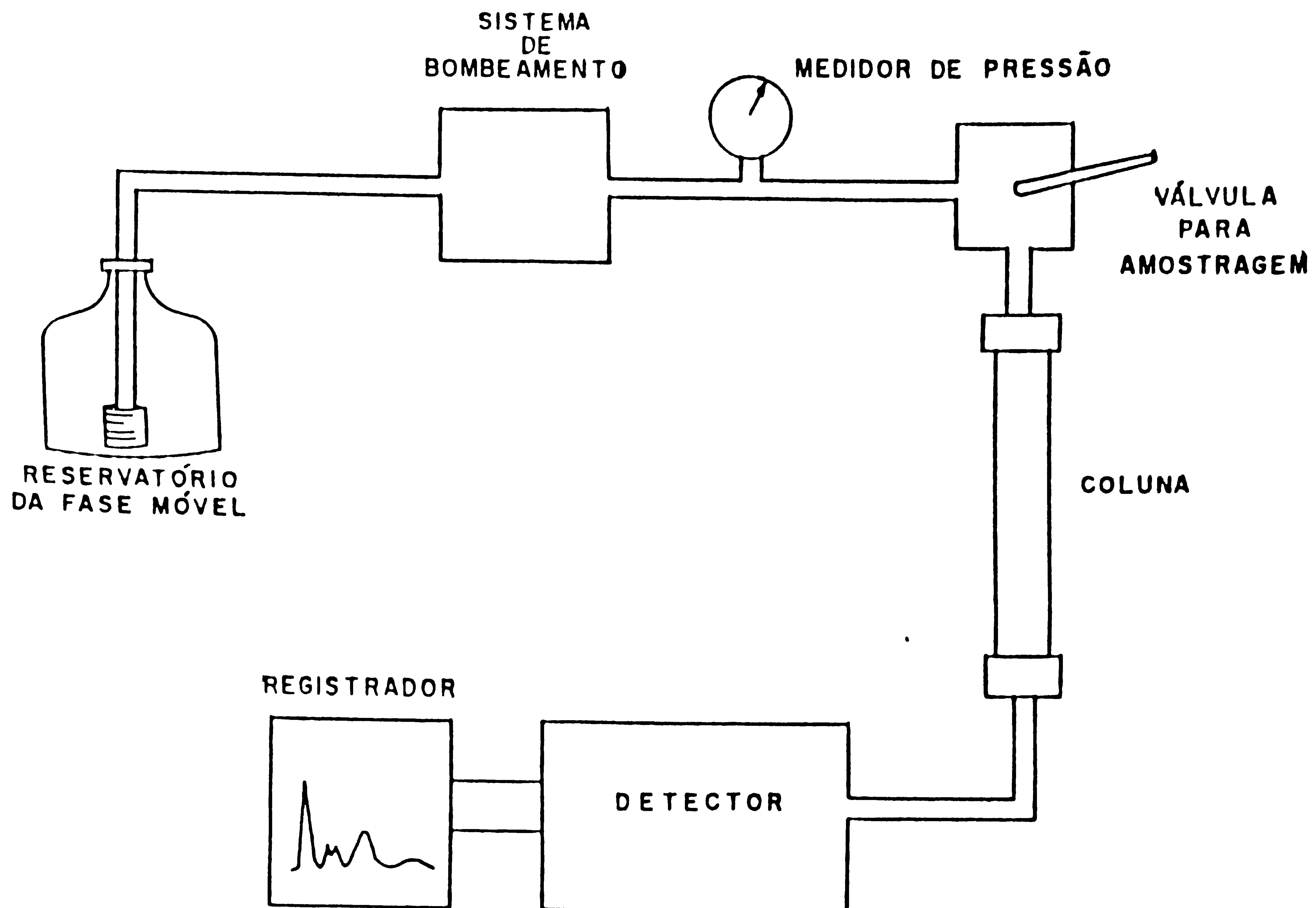



FIGURA IX-4 Esquema de um cromatógrafo para CLAE.

6.1. Reservatório da fase móvel

Podem-se utilizar recipientes de vidro, aço inoxidável ou plástico inertes, com 1 a 3 litros de capacidade, volume normalmente suficiente para um dia de trabalho em separações analíticas.

A captação da fase móvel geralmente é feita através de um filtro, para remover pequenas partículas que podem obstruir e estragar o sistema de bombeamento e a coluna. Este filtro deve ter a capacidade de reter as partículas sem produzir uma queda excessiva de pressão. É também recomendável filtrar a fase móvel antes de colocá-la no reservatório, passando-a através de um filtro metálico ou de cerâmica, de 2 a 5 μm de porosidade.

As fases móveis polares têm uma grande tendência de dissolverem oxigênio e outros gases. Se estes gases se libertarem dentro do equipamento e formarem bolhas, podem afetar seriamente o funcionamento do detector e a eficiência da coluna. Por este motivo, é necessário remover da fase móvel os gases dissolvidos. Em muitos equipamentos, o próprio reservatório está condicionado a efetuar tal remoção. Uma forma é aplicar vácuo dentro do reservatório e agitar a fase móvel magneticamente. Outra maneira muito eficiente é colocar a fase móvel sob a ação de ultra-som e/ou aquecimento.

Atualmente, o problema de formação de bolhas na fase móvel tem sido reduzido com a adição de um filtro na saída do detector, o qual restringe um pouco a vazão e produz uma pequena pressão na cela do detector, que impede a fácil formação de bolhas.

6.2. Sistema de bombeamento

O desenvolvimento do sistema de bombeamento adequado tem sido o fator mais importante para o desenvolvimento da CLAE. A bomba tem que proporcionar uma vazão razoável através da coluna para que a análise não seja lenta e uma vazão constante para não atrapalhar o sistema de detecção.

Os aspectos mais importantes para o sistema de bombeamento são:

a. Pressão máxima de operação na faixa de 600 bars.

b. Vazão contínua sem pulsos, ou, se pulsando, com amortecedor de pulsos.

c. Intervalo de vazões entre 0,01 e 10 mL/min para aplicações analíticas e até 100 mL/min para aplicações preparativas.

d. Reprodutibilidade e constância da vazão de 1%.

e. Inércia química a solventes comuns.

f. Pequeno volume bombeado (máximo de 0,5 mL) nos sistemas com bomba de pistão, para uso em eluição com gradiente e reciclagem.

De acordo com as características de funcionamento e desenho pode-se considerar basicamente dois tipos de bombas, as mecânicas e as pneumáticas. Entre as bombas mecânicas existem dois tipos diferentes, recíprocas (pistão ou diafragma) e tipo seringa.

6.2.1. Bombas recíprocas

São bombas que escoam volumes constantes de forma não contínua, isto é, pulsante. A pressão máxima que se pode obter varia conforme o desenho, mas em geral é de aproximadamente 600 bars.

A forma como operam estas bombas é a seguinte: mediante o movimento de um pistão ou diafragma e através de um sistema de válvulas que alternadamente se abrem e fecham, se enche e esvazia, de modo alternativo, uma pequena câmara. O volume que a bomba envia em cada pulso se ajusta variando a distância a que se desloca o pistão ou diafragma e a vazão total se ajusta variando o número de deslocamentos por unidade de tempo (*Figura IX-5*).

Uma das desvantagens deste tipo de bomba é que se obtém uma vazão pulsando e não em forma contínua e uniforme. Isto pode causar perda na eficiência da coluna e instabilidade do detector e, portanto, é necessário eliminar estas pulsações mediante algum sistema amortizador. Uma forma sensível e conveniente é colocando uma seção comprida de um tubo capilar (por ex., 6 m de comprimento com 1 mm de diâmetro interno) entre a bomba e a câmara de injeção; este tubo capilar se deixa "flotar" livremente e assim absorve-se as pulsações produzidas pela bomba.

A vazão de volume constante, apesar das variações na queda de pressão através da coluna, constitui a vantagem principal destas bombas. De uma maneira geral, utilizam-se manômetros do tipo Bourdon para medir a pressão na qual está trabalhando a bomba. Este manômetro também ajuda a amortizar, em parte, as pulsações. Uma vantagem a mais destas bombas é a capacidade de alimentar, de modo contínuo, o sistema.

PARA A COLUNA

ANEL HERMÉTICO

VÁLVULAS UNIDIRECIONAIS

DO RESERVATÓRIO
DA FASE MÓVEL

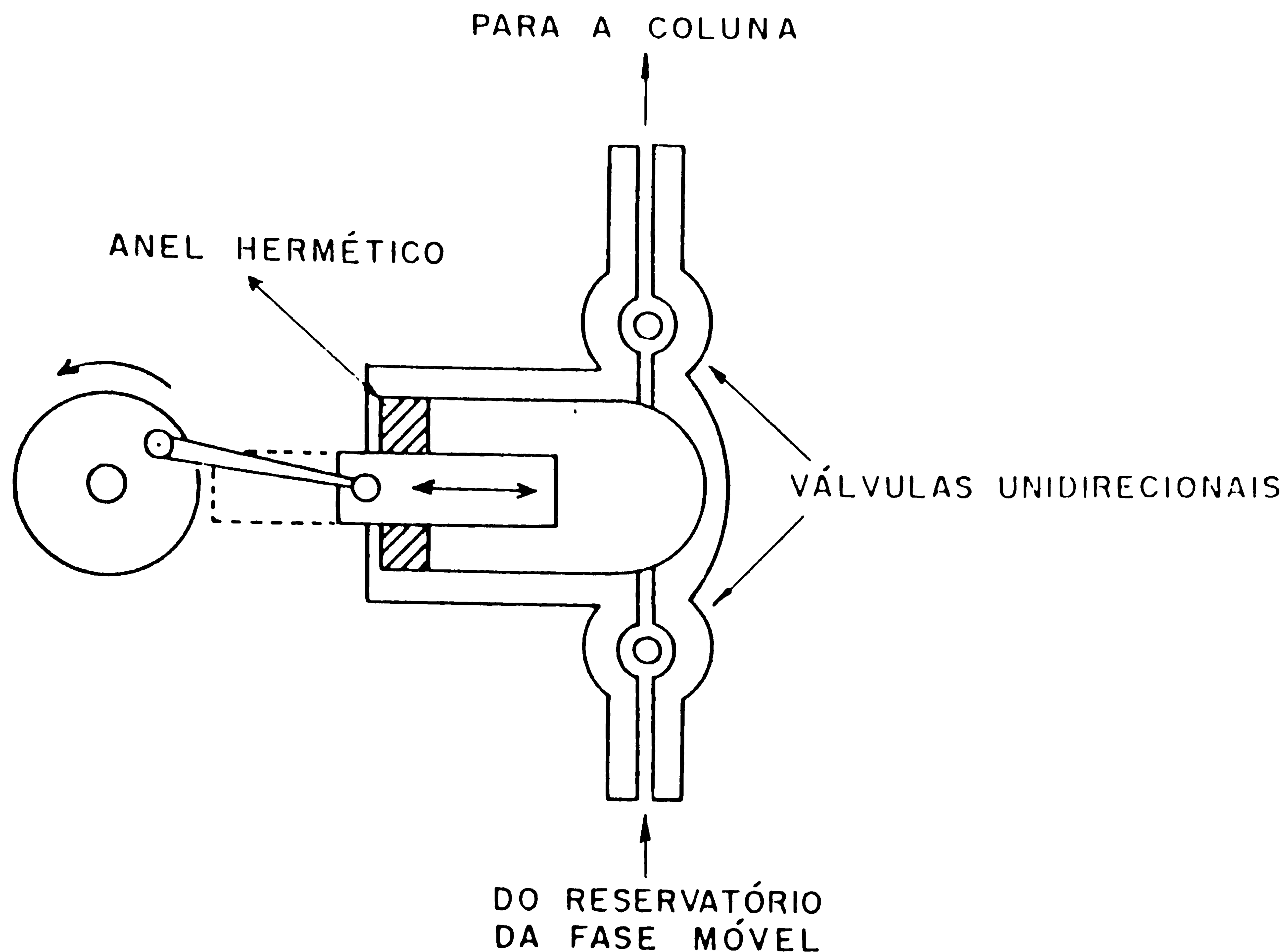



FIGURA IX-5 Bomba recíproca.

Avanços recentes no desenho deste tipo de bomba constitui a bomba de duplo pistão, acionada por um só motor através de um eixo excêntrico, de forma tal que quando um pistão succiona a fase móvel o outro expulsa o líquido para fora da bomba. A vazão de ambos pistões, já quase livre de pulsações, é encaminhada à coluna por uma via comum.

6.2.2. Bombas tipo seringa

Chamadas também de êmbolo ou de deslocamento contínuo, estas bombas são aquelas em que um êmbolo ou pistão é deslocado de forma contínua e uniforme por um motor de precisão, comprimindo o líquido contido em uma câmara de um certo volume. O líquido flui através de uma abertura na mesma câmara e se obtém assim uma vazão que pode variar conforme se desloca o êmbolo a uma maior ou menor velocidade (*Figura IX-6*).

A vazão deslocada por esta bomba é uniforme e contínua, ou seja, livre de pulsações, mas a capacidade da câmara é limitada e, para reenchê-la, é necessário suspender momentaneamente sua operação.

As vazões deslocadas por estas bombas variam entre 0,1 μL/min a 5 mL/min a pressões de até 600 bars. Seu custo é um pouco elevado e sempre existe certa dificuldade ao reencher a bomba com uma nova fase móvel. Este problema de reabastecimento da bomba é solucionado quando usamos colunas com microdiâmetro onde o volume de fase móvel necessário é pequeno. Hoje em dia, muito poucos instrumentos empregam este tipo de bomba devido ao seu alto custo e as vantagens das bombas recíprocas. Por outro lado, esta bomba é preferida quando utiliza-se colunas com diâmetro interno reduzido ($<$ 2 mm) onde há necessidade de se ter uma vazão completamente livre de pulsos.

PARA A COLUNA

RESERVATÓRIO DA FASE MÓVEL

ANEL HERMÉTICO

MOTOR

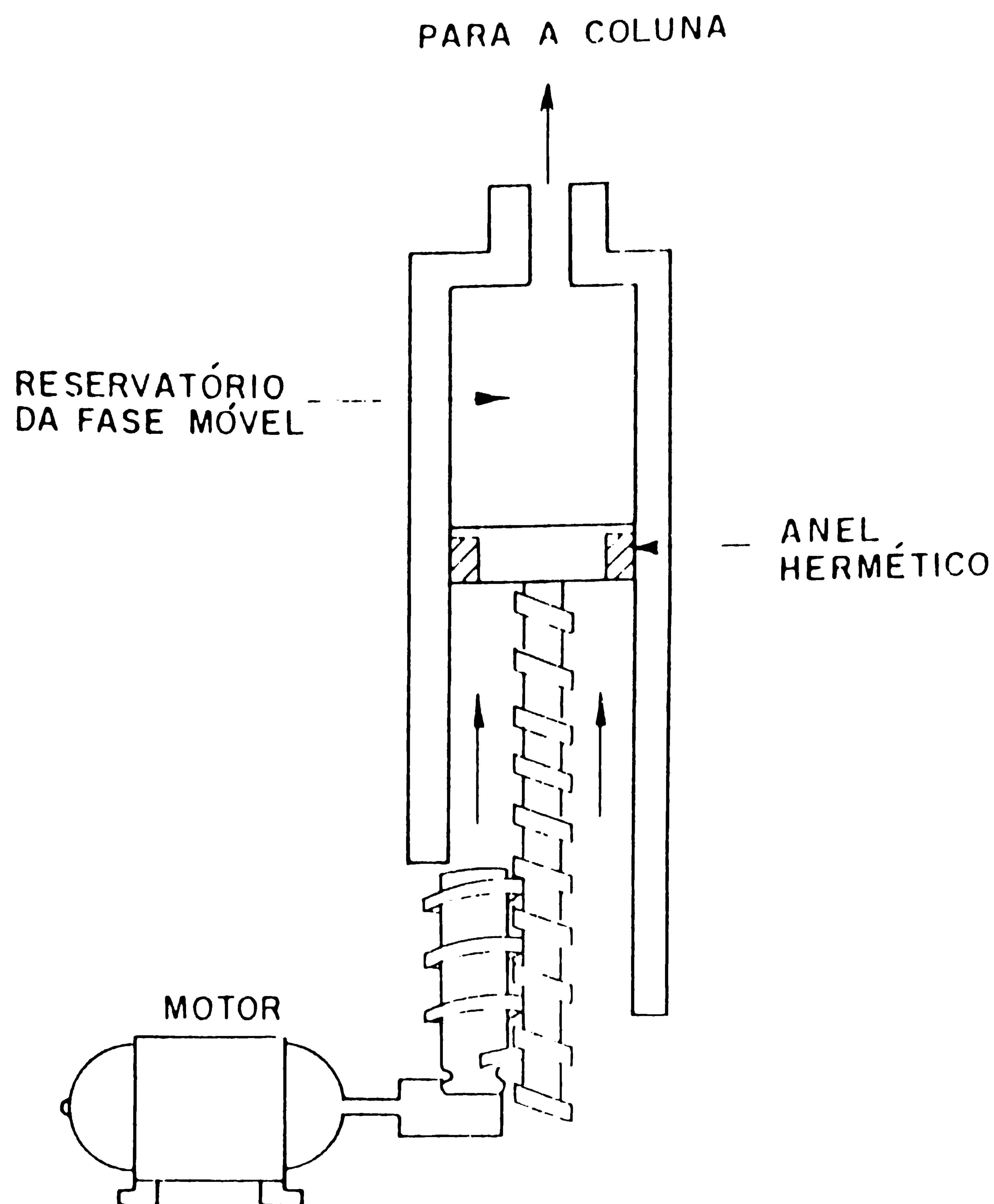



FIGURA IX-6 Bomba tipo seringa.

6.2.3. Bombas pneumáticas

Neste sistema de bombeamento o líquido é deslocado mediante a pressão exercida por um gás inerte a alta pressão: pode ser feito de forma direta sobre o líquido ou sobre o recipiente comprimível que o contém.

A pressão máxima possível está limitada pela própria pressão do gás e pelo material de fabricação do sistema. As vazões obtidas estão livres das pulsações e são de pressão constante, o que significa que se a resistência à pressão da coluna muda, a vazão também mudará.

Além do limite na pressão máxima útil, as desvantagens destas bombas são a capacidade limitada no volume total que pode ser bombeado e a difusão que apresenta o gás no líquido quando está em contacto direto. Este último problema pode-se resolver utilizando algum tipo de interface entre o líquido e o gás, evitando o contacto direto entre eles.

Neste tipo de bombas existem alguns desenhos especiais que empregam sistemas amplificadores de pressão, o que permite obter pressão até 400 bars utilizando baixas pressões de gás (*Figura IX-7*).

PARA A COLUNA

ANEL HERMÉTICO

RESERVATÓRIO DA FASE MÓVEL

GÁS

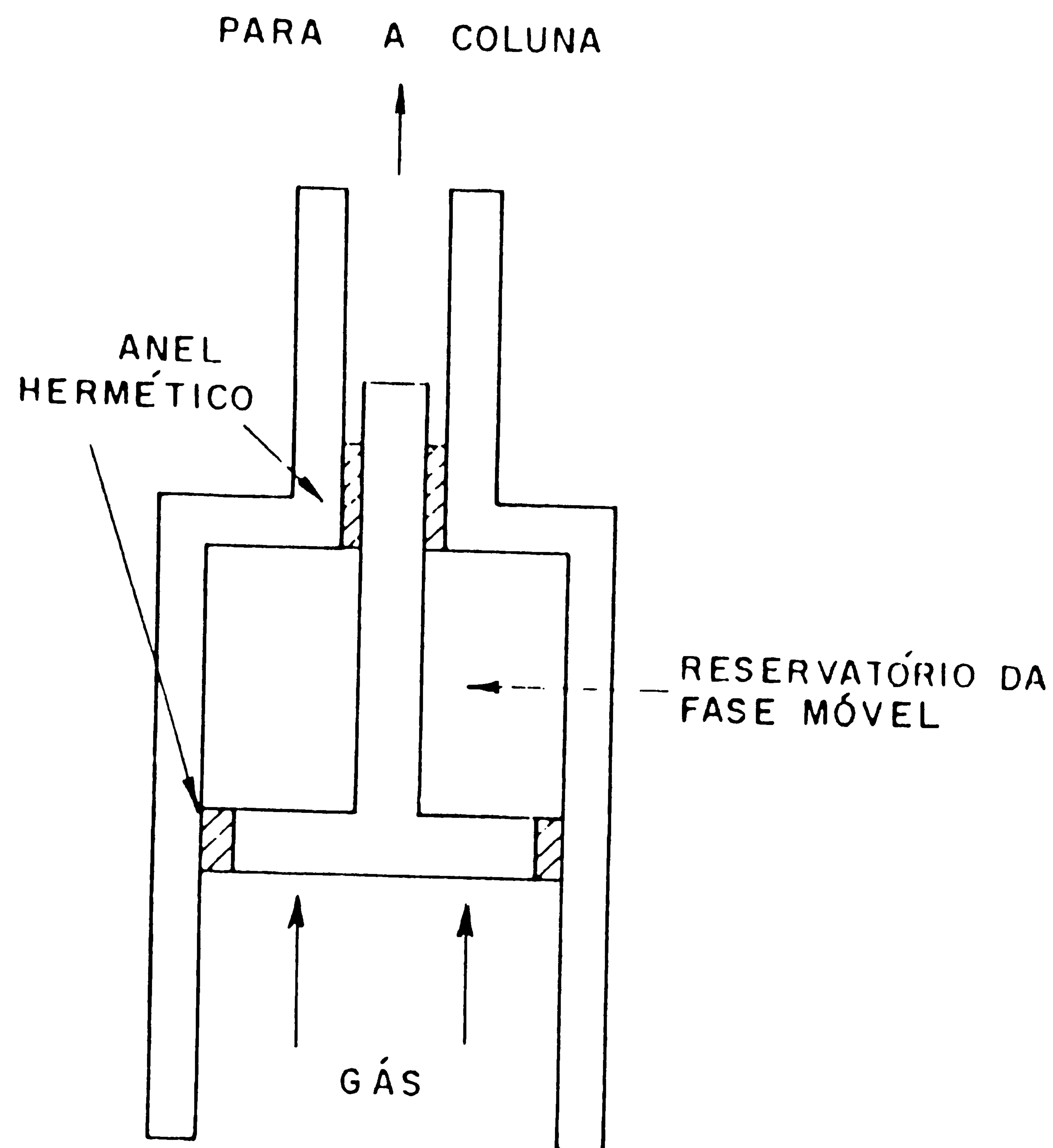



FIGURA IX-7 Bomba pneumática.

6.3. Programadores de fase móvel

Esta técnica, que equivale a programação de temperatura na cromatografia gasosa, consiste em trocar a composição da fase móvel conforme transcorre a análise. Geralmente usa-se solventes de diferente polaridades e varia-se a porcentagem destes em mistura binária ou ternária.

A *Figura IX-8* mostra gráficos de composição da fase móvel em função do tempo, para eluição isocrática e por gradiente. A composição ou polaridade da fase móvel se modifica a diferentes velocidades dependendo da programação.

As vantagens que oferece esta técnica são análises mais rápidas, melhores separações e maior simetria nos picos, em contraste à eluição isocrática (composição constante da fase móvel) que pode tomar muito tempo com forma de picos nem sempre adequadas. As desvantagens incluem a necessidade de regenerar a coluna antes de fazer uma nova injeção de amostra e a incompatibilidade com o detector em certos casos.

Um bom programador de fase móvel é um dispositivo muito complexo e por isto pode ficar tão caro como o próprio cromatógrafo. Basicamente existem 2 tipos de programadores:

a. Programadores que efetuam a mistura em uma câmara, depois o líquido passa para a bomba, que envia a mistura para a coluna.

b. Programadores de mistura em corrente que requerem duas ou mais bombas. Estes programadores são muito mais versáteis, permitindo criar qualquer forma de gradiente, mas também são muito mais caros.

Os programadores podem também ser empregados para criar misturas isocráticas e, inclusive, para regenerar colunas quando isto é necessário. O emprego de microprocessadores (que pode ser o mesmo utilizado no tratamento de dados) permite atualmente usar programadores para gradiente de forma totalmente automática.

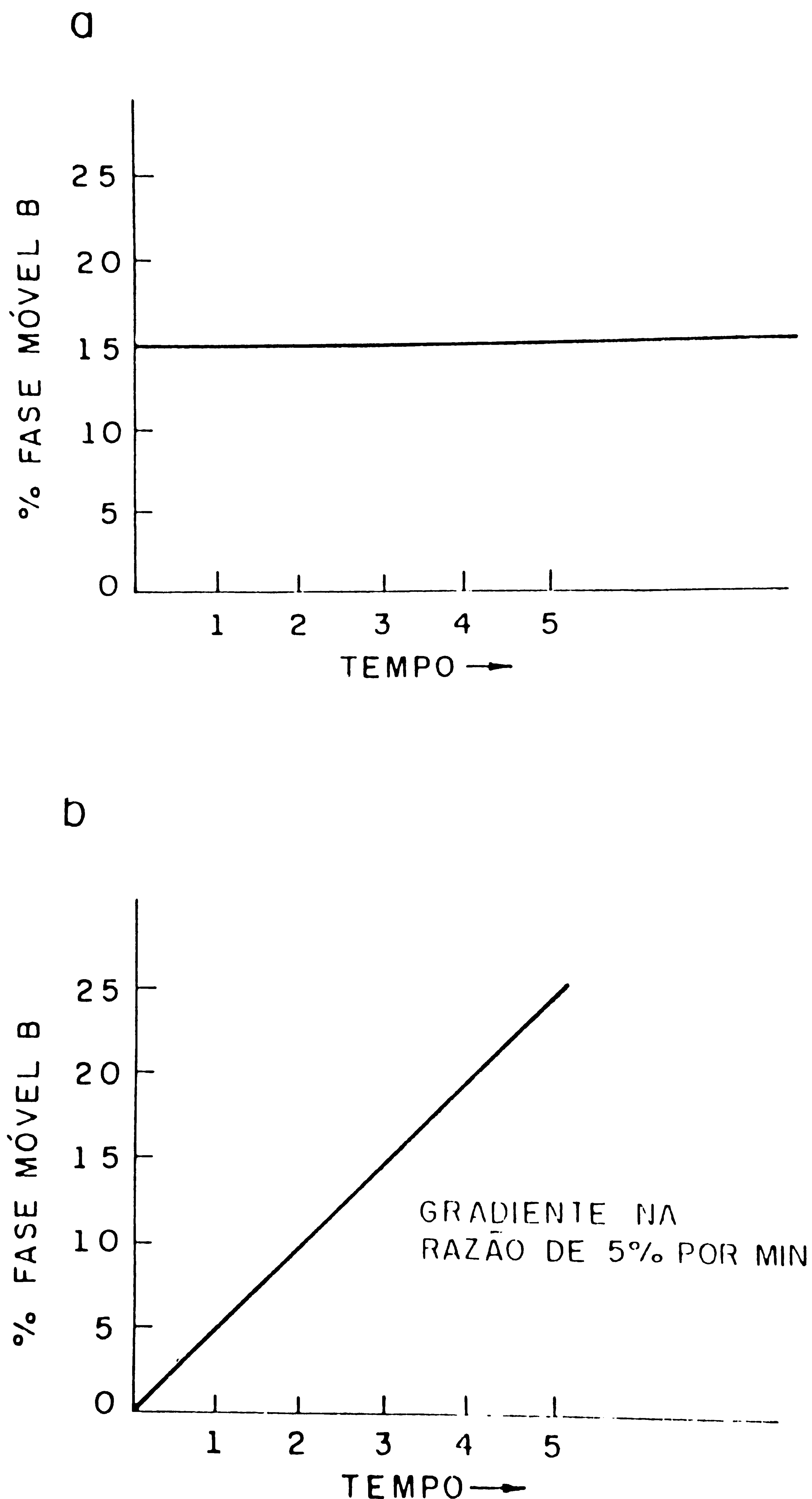



FIGURA IX-8 Composição da fase móvel na eluição isocrática (a) e na eluição por gradiente (b).

6.4. Medidor e controlador de pressão

A pressão é dependente da permeabilidade da coluna, da viscosidade da fase móvel, do diâmetro das partículas da fase estacionária e do comprimento da coluna.

Monitores de pressão são importantes no equipamento da CLAE como instrumentos de diagnóstico para otimizar a separação e indicar problemas com o sistema, como entupimentos ou vazamentos. Medidores do tipo Bourdon ou diafragma são simples, baratos e resistentes. Por outro lado, o transdutor da pressão é mais preciso e tem um menor volume interno, que facilita a troca dos solventes. Além disso, estes últimos podem ser equipados com um alarme ou com um sistema de desligamento automático das bombas para pressões máximas ou mínimas, protegendo o sistema contra sobrecarga de pressão alta em conseqüência de um entupimento da coluna ou contra incêndio e deterioração, devido a vazamentos da fase móvel (baixa pressão). Usando os medidores mais simples com bombas que deslocam volumes constantes, é recomendável empregar uma válvula de segurança que libera a pressão do sistema quando alcançar um limite superior ao normal.

6.5. Válvulas para amostragem

Até pouco tempo atrás, a introdução da amostra era efetuada de forma muito similar a realizada na cromatografia gasosa, ou seja, mediante uma microsseringa com que se injeta a amostra dentro de uma pequena câmara, onde, posteriormente, é diluída e arrastada pela fase móvel.

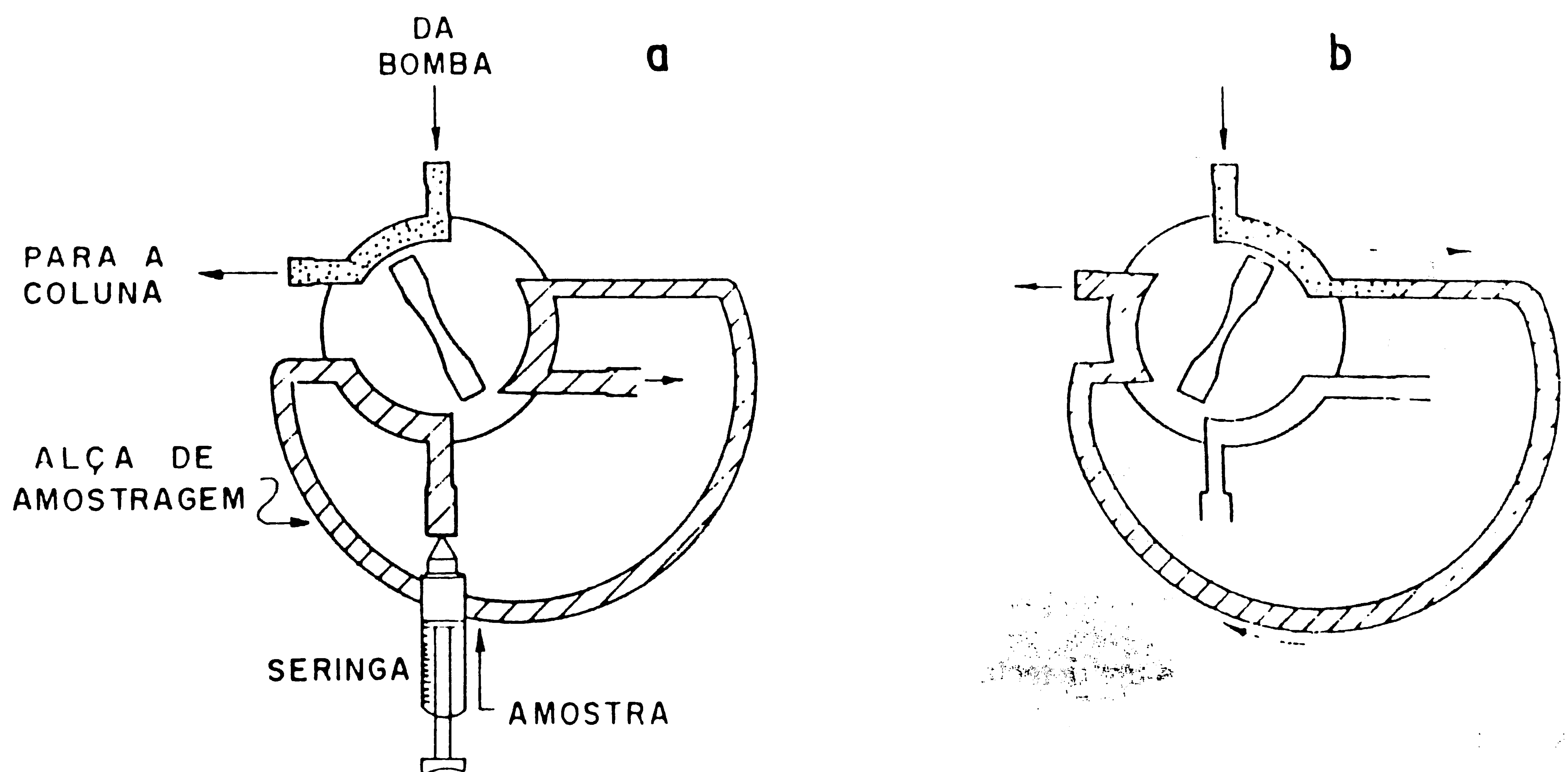



FIGURA IX-9 Válvula de amostragem para a CLAE. a: posição para carregar; b: posição para injeção.

O equipamento moderno emprega, em geral, válvulas para amostragem, como a ilustrada esquematicamente na *Figura IX-9.* A amostra, introduzida na válvula mediante uma seringa, deve encher o espaço interno de uma pequena porção de tubo capilar de aço, a alça de amostragem (*Figura IX-9a*). Normalmente o volume contido na alça é de 1 a 100 μL. A amostra é injetada na coluna, acionando a válvula para que a posição da entrada e saída mude, como é mostrado na *Figura IX- 9b*. Desta forma pode-se injetar, a uma pressão qualquer, um intervalo amplo de volume de amostra (o tubo capilar pode ser trocado rapidamente por outro de tamanho diferente) com um alto grau de reprodutibilidade.

As válvulas para amostragem são fabricadas somente de materiais inertes, como teflon e aço inoxidável, e seu desenho é tal que resistem a pressões muito elevadas.

6.6. Detectores usados em CLAE

Uma instrumentação melhor é requerida para a CLAE em relação à sensibilidade dos detectores para a monitorização do efluente que sai da coluna. Infelizmente as propriedades físicas ou físico-químicas da amostra e fase móvel são, muitas vezes, similares. Algumas soluções para o problema de detecção têm sido procuradas no desenvolvimento da CLAE:

- medidas diferenciadas de propriedades gerais de ambas, amostras e fase móvel.
- medidas de uma propriedade da amostra que não é apresentada pela fase móvel.
- detecção após a eliminação da fase móvel.

Uma variedade de detectores tem sido desenvolvida para a CLAE, baseando-se em uma destas soluções. Um detector ideal para a CLAE seria aquele com as seguintes características:

a. Alta sensibilidade e baixo limite de detecção.
b. Resposta rápida a todos os solutos.
c. Insensibilidade a mudanças na temperatura e na vazão da fase móvel.
d. Resposta independente da fase móvel.
e. Pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da cela do detector.
f. Resposta que aumente linearmente com a quantidade de soluto.
g. Não destruição do soluto.
h. Segurança e conveniência para uso.
i. Informação qualitativa do pico desejado.

Infelizmente, não existe um detector que apresente todas estas propriedades, a não ser que ele seja desenvolvido.

Atualmente, os detectores não são versáteis, ou universais, nem apresentam as opções desejadas. Não existe equivalente para CLAE dos detectores por condutividade térmica ou por ionização em chama como existe para a cromatografia gasosa. Contudo, existem detectores que oferecem uma ampla faixa de aplicações; raramente há um emprego da CLAE seriamente comprometido pelo detector. Se os componentes da amostra são desiguais e diferem totalmente em suas propriedades físicas e físico-químicas,

pode ser necessária a utilização de dois ou mais detectores em série, para assegurar que cada um dos componentes de interesse seja medido adequadamente.

O propósito desta seção é informar quais os detectores mais usados, incluindo suas características, vantagens e limitações na CLAE. Ao considerar-se um detector em termos de sua aplicação a um determinado problema, ou avaliar as qualidades de um certo modelo, deve-se levar em conta certos parâmetros gerais.

Um detector pode ser seletivo ou universal, segundo a sua capacidade de trabalhar com um só tipo de amostra específica ou com todos tipos de amostras. Em geral os detectores universais são os mais procurados, principalmente pelos laboratórios de pesquisa onde se trabalha com diversos tipos de amostras. Os seletivos, que podem ser mais sensíveis e efetuam melhor a análise de amostras complexas porque detectam certos componentes em quantidade muito pequenas, têm grande interesse para laboratórios que efetuam análises rotineiras.

A sensibilidade é considerada como a relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. Este é um termo relativo porque a partir de um mesmo detector, o sinal obtido pode ser muito diferente para diversas amostras.

Tabela IX-12

Características de alguns detectores de cromatografia líquida de alta eficiência

	Detector por espectrofotometria UV-visível	**Detector por fluorescência**	**Detector por índice de refração**	**Detector eletroquímico (eletrodo de Hg gotejante)**	**Detector por condutividade elétrica**
princípio de operação	absorvância de luz na faixa UV-visível	excitação com luz produz uma emissão Fluorescente	mudanças no índice de refração da fase móvel	oxidação ou redução em potencial fixo	condutividade elétrica devida a presença de íons
tipo	seletivo depende prop. composto	altamente seletivo depende prop. composto	universal depende prop. fase móvel	seletivo depende prop. composto	seletivo depende prop. composto
quantidade mínima de detecção (g/mL)	fixo: $2x10^{-10}$ var: 10^{-9}	Hg: 10^{-9} laser: 10^{-12}	10^{-7}	10^{-12}	10^{-8}
faixa de linearidade	10^{5}	10^{3}	10^{4}	10^{6}	$2x10^{4}$
volume de cela (μL)	1-20	10-25	3-15	5-10	1,5-2,5
sensibilidade à temperatura	baixa	baixa	alta	média	média
sensível à vazão da fase móvel	não	não	não	sim	sim
útil com gradientes	sim	sim	não	não	não
aplicações	compostos que absorvem no comprimento selecionado	compostos (ou derivados) que fluorescem	geral	espécies que oxidam ou reduzem	soluções aquosas com compostos iônicos

A linearidade é a faixa linear do sistema, onde o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do soluto; ela é importante em análises quantitativas. Se a concentração da amostra é muito alta para a faixa linear, uma diluição apropriada pode ser feita.

O limite mínimo de detecção é a menor quantidade de substância que pode ser detectada, produzindo um sinal igual ao dobro do nível do ruído do instrumento. Ruído é a variação no sinal do instrumento que não é atribuído à amostra e que pode ser produzido por falhas eletrônicas, aparelhos mal aterrados, variações da vazão ou temperatura, flutuação na voltagem, bolhas de ar no detector, etc. Por isto se deduz porque um detector muito sensível, mas muito ruidoso, pode não ser tão útil como um menos sensível, mas com um nível de ruído mais baixo.

Trocas na composição da fase móvel poderão produzir grandes flutuações na linha de base; o problema mais sério para alguns detectores aparece quando a composição é trocada deliberadamente na eluição por gradiente.

A classe de detectores mais usada na CLAE são os fotométricos, baseados na absorvância no ultravioleta e no visível, depois são os refratométricos e, finalmente, as classes especiais, que de uma maneira geral são mais específicos e menos utilizados. A *Tabela IX-12* resume algumas propriedades destes detectores enquanto as seções a seguir indicam algumas das suas outras características.

6.6.1. Detectores por absorvância no ultravioleta e no visível

Nos detectores espectrofotométricos o seu funcionamento se baseia na absorvância da luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre no ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda. É lógico supor que a resposta deste detector será seletiva, porque só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que opera o detector. Mas deve ser lembrado que uma grande maioria de substâncias absorvem a radiação UV, incluindo todas as substâncias que têm elétrons nas ligações π e aqueles que têm elétrons não emparelhados como, por exemplo, olefinas, aromáticos e compostos contendo $>C=O$, $>C=S$, $-N=O$ e $-N=N-$.

Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de onda variável (espectrofotômetros), que não só é de aplicação mais variada e sensível, mas também mais caro, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos. Este último é sensível, econômico e mais que suficiente para se conseguir bons resultados com todos os compostos que absorvem luz no comprimento de onda em que ele funciona. Este tipo de detector é relativamente insensível às variações de vazão e temperatura. Quando os componentes da fase móvel não absorvem em um grau significativo, no comprimento de onda que opera o detector, será muito fácil realizar análises empregando gradiente. A maioria dos detectores de comprimento de onda fixo, oferecidos no comércio, operam em um comprimento de onda de 254 nm e um de 280 nm, resultado da absorvância de luz de 254 nm e da emissão de luz de 280 nm por uma substância fosforescente. Em ótimas condições pode-se atingir sensibilidades até 0,001 unidade de absorvância e, se o composto absorve intensamente na faixa do ultravioleta, é possível detectar quantidades de amostras da ordem de décimos de nanograma (10^{-10}g).

Um desenho esquemático deste detector de comprimento de onda fixo é mostrado na *Figura IX-10*. A radiação UV a 254 nm, de uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão, é transmitida através da cela da amostra. A quantidade de radiação não absorvida atinge a célula fotoelétrica da amostra. Esta radiação da fonte é dirigida também através de um divisor de feixe para a cela de referência e ao atravessá-la atinge a célula fotoelétrica de referência. A diferença de corrente destas células fotoelétricas alimenta um amplificador, que gera um sinal de saída, linear com a concentração do soluto, para o registrador.

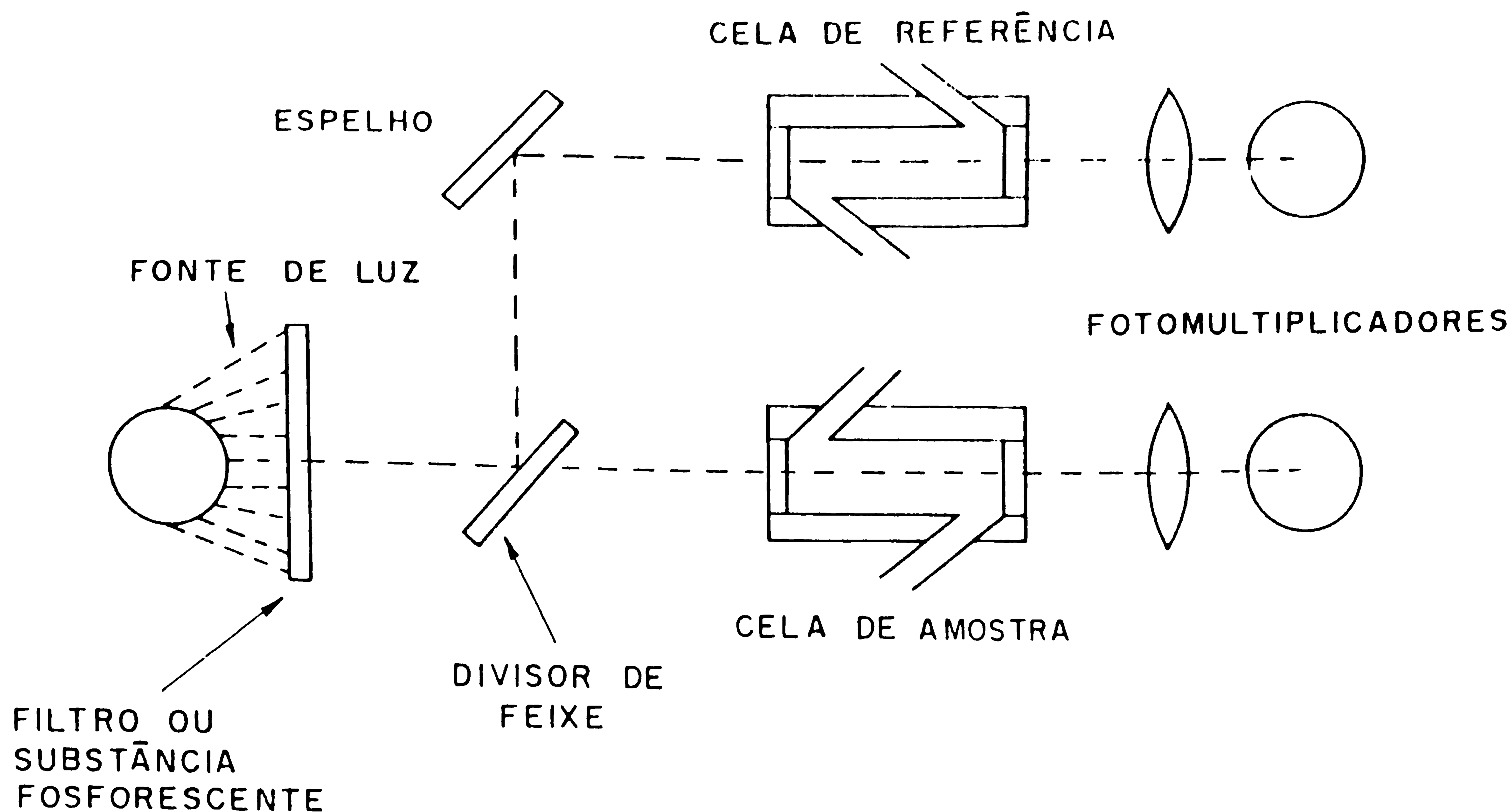



FIGURA IX-10 Esquema de um detector por absorvância no UV, com comprimento de onda fixo.

Quando se aplica gradiente na fase móvel e ela apresenta variação significativa de absorvância para o ultravioleta, é necessário utilizar a cela de referência para compensar esta variação. Se a fase móvel não absorve ou se a absorvância é constante, pode-se deixar a cela de referência vazia ou cheia com um dos componentes da fase móvel.

Alguns compostos absorvem na região visível do espectro eletromagnético e podem ser analisados por um detector que funciona nesta região do espectro. Contudo, reagentes podem ser adicionados ao efluente de uma maneira contínua, ou periodicamente, para formar compostos coloridos que podem ser monitorizados por este detector. Esta técnica é usada no analisador automático de aminoácidos onde a cor púrpura, obtida pela reação do aminoácido com a ninidrina, é detectada a 570 nm. Alguns reagentes que desenvolvem cor são bem gerais em suas reações ao passo que outros são muito específicos. Assim, a técnica pode ser usada para detecção quase universal ou mais específica.

Na faixa do visível os detectores por absorvância (lâmpada de tungstênio) podem ter comprimento de onda fixo com filtros, ou variável com monocromador.

Espectrofotômetros de comprimentos de onda variável UV-VIS, cobrindo a faixa de 190 a 800 nm, através de monocromador que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (VIS), oferecem várias vantagens sobre os instrumentos de comprimento de onda fixo:

a. Apresentar alta absorvância para vários componentes devido a escolha de comprimento de onda e, conseqüentemente, ter maior sensibilidade.

b. Permitir maior seletividade, desde que um determinado comprimento de onda pode ser escolhido, onde o soluto de interesse absorve bastante e outros não.

c. Promover eficiência em eluição por gradiente através da habilidade de selecionar um comprimento de onda onde os componentes da fase móvel não apresentam uma variação de absorvância para diferentes concentrações.

d. Permitir obter o espectro de absorvância de cada componente em separado após parar a vazão da fase móvel.

A *Figura IX-11* mostra um diagrama ilustrado deste tipo de detector.

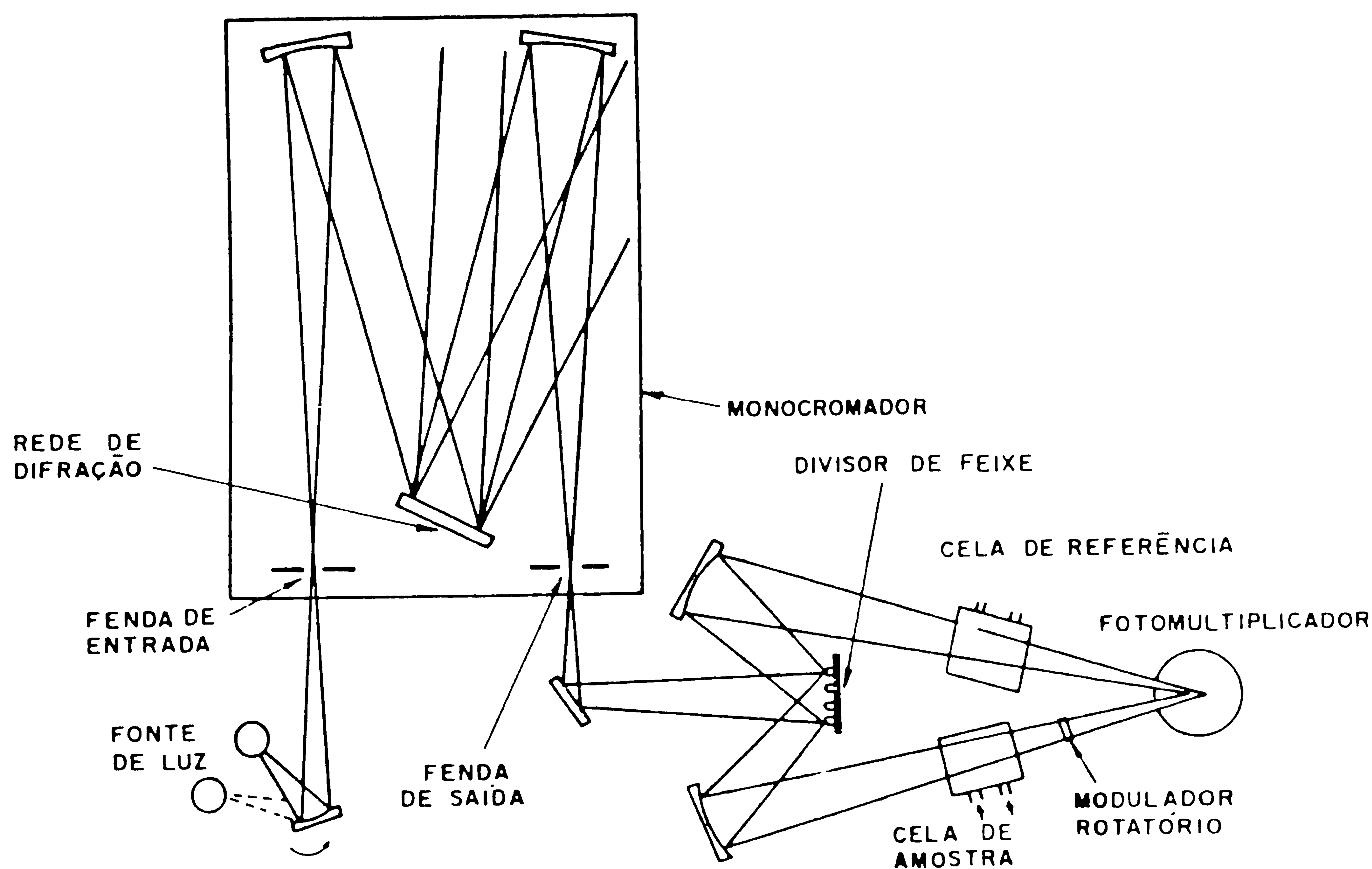



FIGURA IX-11 Esquema de um detector por absorvância no UV e VIS, com comprimento de onda variável.

Análises em diferentes comprimentos de onda também são possíveis com os detectores espectrofotométricos por conjunto de fotodiodos. Como indica a *Figura IX-12*, toda a luz da fonte passa pela cela do detector. A luz emergente é dispersada por uma grade holográfica, sendo os comprimentos de onda resultantes focalizados sobre uma fila de fotodiodos (de 256 até 512). Com isto, todo o espectro pode ser armazenado usando um microcomputador, eliminando a necessidade de parar o fluxo da fase móvel para registrar um espectro de um dado componente. Com este detector, o microcomputador pode produzir um cromatograma a partir de um dado comprimento de onda ou uma série de espectros em intervalos de tempo fixos (*Figura IX-13*).

Além do alto preço destes detectores com comprimento de onda variável, existe uma outra desvantagem: ser instrumentos relativamente complexos. Outra desvantagem, em detectores mais velhos: o volume da cela do detector é relativamente grande. Nos detectores mais novos, as celas têm volumes de 1 a 8 μL e um comprimento para passagem da luz de 1 cm. O volume pequeno evita o alargamento da base do pico por dispersão pós-coluna.

Para todos os tipos de detectores por absorvância no UV e no visível, a pureza espectroscópica da fase móvel é importante, especialmente quando se faz a detecção em comprimentos de onda menores do que 240 nm (ver Apêndice 4). As fases móveis ideais são os solventes de grau cromatográfico; os de grau espectroscópicos não são recomendados porque podem conter preservativos que afetam a etapa de

separação. Com estes detectores, em ótimas condições, pode-se atingir sensibilidades de até 0,001 unidade de absorvância e, se o composto absorve intensamente, limites de detecção da ordem de nanograma.

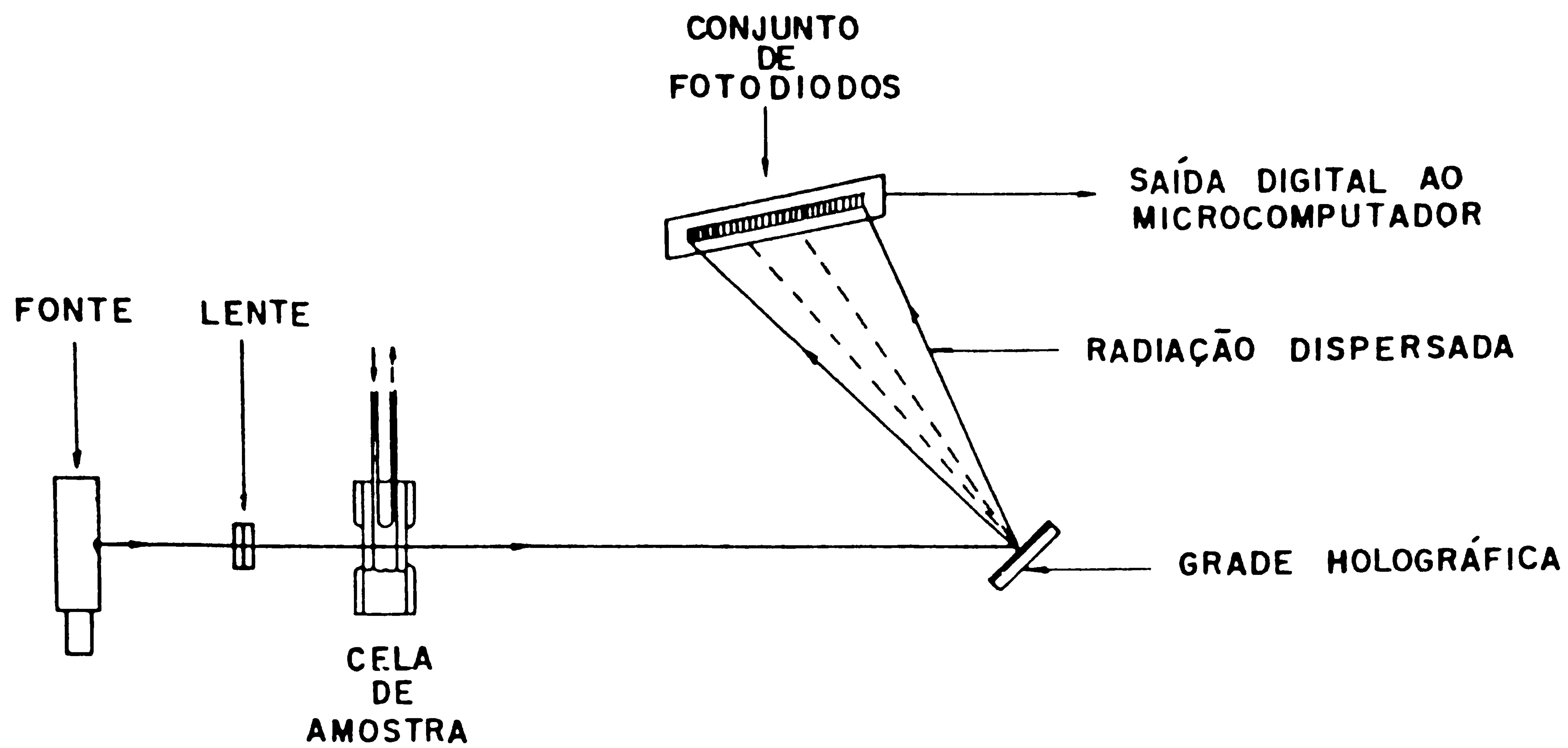



FIGURA IX-12 Esquema de um detector espectrofotométrico por conjunto de fotodiodos.

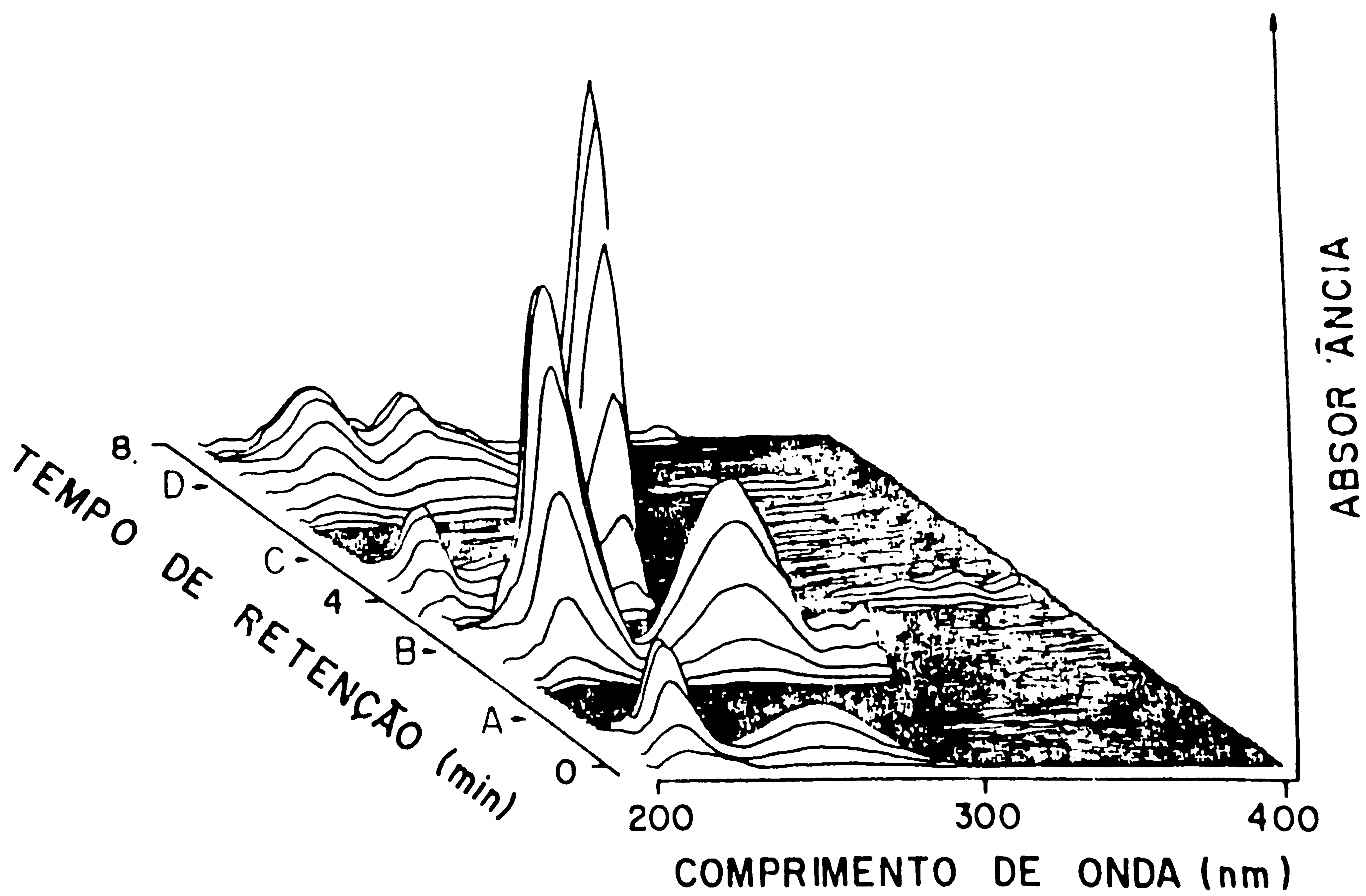



FIGURA IX-13 Mapa em três dimensões produzido pelo microcomputador acoplado a um detector espectrofotométrico por conjunto de fotodiodos. O intervalo entre espectros é de 4 segundos. Os compostos são: A: naftaleno; B: fluoreno; C: antraceno; D: criseno.

6.6.2. Detectores por absorvância no infravermelho

A absorvância na região do infravermelho pode ser usada como detector universal ou específico. A sensibilidade destes detectores, oferecidos no comércio, é muito pequena para as quantidades de amostra normalmente usadas, mas eles são usados com sistemas de CLAE por exclusão.

Usando a técnica de parar a vazão com a amostra na cela e tirar o espectro infravermelho, dará uma imagem analítica completa da amostra. Este tipo de detector é limitado pela fase móvel que deve ser transparente no comprimento de onda utilizado.

6.6.3. Detectores por fluorescência

A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção específica e é um dos mais sensíveis da atualidade para compostos que fluorescem. Em boas condições é possível detectar com este detector quantidades de ordem de picograma (10^{-12} g), o que é comparável aos detectores por captura de elétrons em CG. Uma alta intensidade de fluorescência é esperada de compostos que sejam conjugados simetricamente ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas. Fluorescência pode ser desenvolvida em compostos não fluorescentes por reações realizadas pós-coluna; por exemplo, esteróides podem produzir fluorescência quando aquecidos em ácido sulfúrico. As principais áreas de aplicação são nas análises de alimentos e produtos farmacêuticos e para a caracterização de destilados de petróleo de alto ponto de ebulição.

A fase móvel empregada nos detectores por fluorescência deve ser cuidadosamente selecionada porque a intensidade de emissão depende totalmente do meio em que se encontra a amostra. Isto dificulta algumas de suas aplicações, tais como análise quantitativa e eluição por gradiente, nas quais deve-se selecionar os componentes da fase móvel para não atrapalhar a fluorescência.

Um esquema do detector por fluorescência é mostrado na *Figura IX-14*. O filtro primário é escolhido para deixar passar somente o comprimento de onda excitante. O secundário é escolhido para eliminar o comprimento de onda excitante, mas deixa passar o comprimento de onda emitido pela amostra.

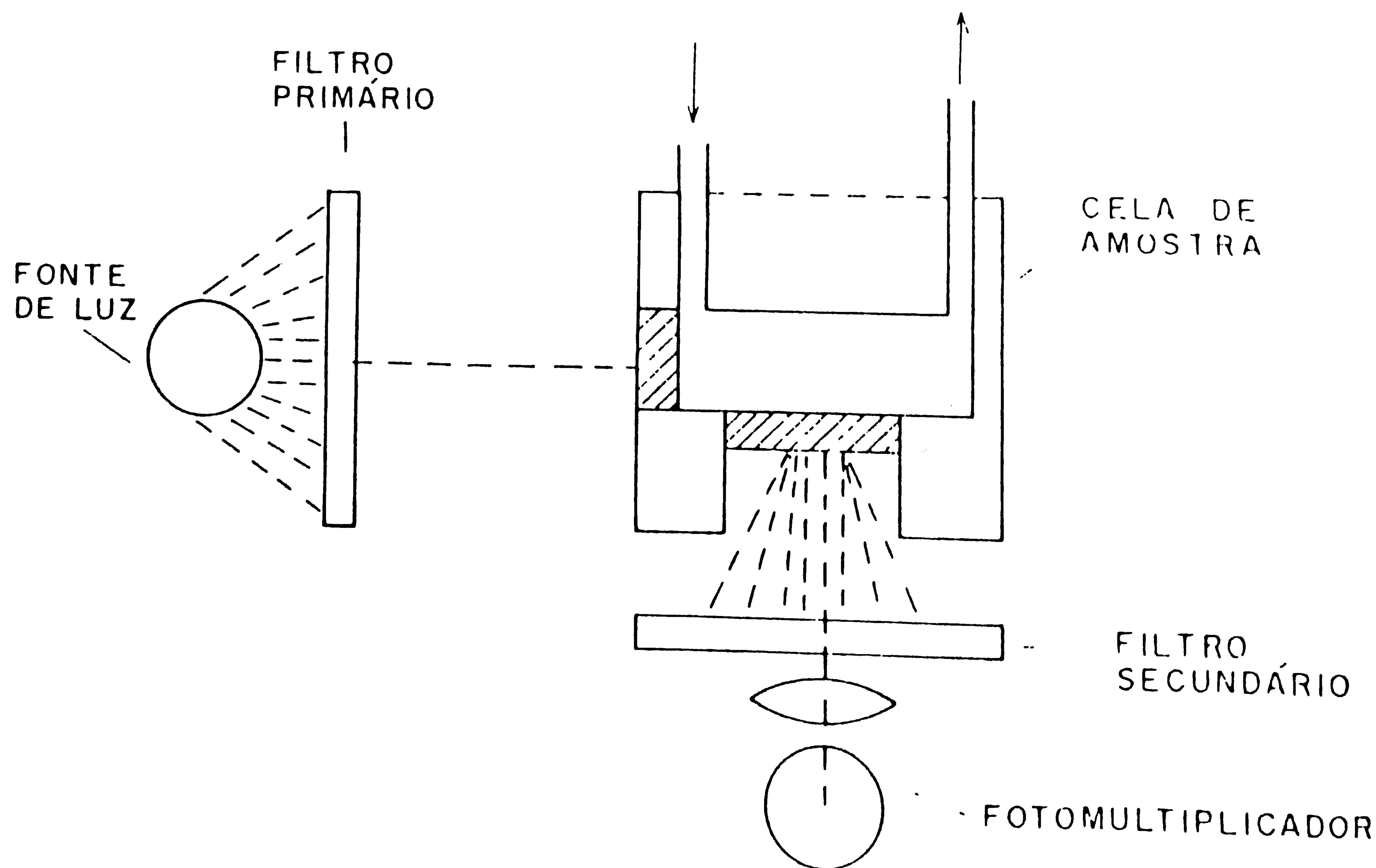



FIGURA IX-14 Esquema de um detector por fluorescência.

Os detectores por fluorescência podem também proporcionar espectros de emissão das amostras retidas momentaneamente na sua cela.

Desde que uma fonte de UV é necessária em ambos detectores, por absorvência no UV e por fluorescência, eles podem ser combinados em um só detector.

6.6.4. Detectores por índice de refração

O detector por índice de refração é o segundo detector mais usado na CLAE. Este detector acompanha continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra.

Para solutos que não absorvem no UV ou visível e, conseqüentemente, não são detectados pelos detectores espectrofotométricos, a melhor escolha é o detector por índice de refração. A resposta deste detector é universal e a sua sensibilidade é moderada, geralmente da ordem de micrograma (10^{-6} g.). Este nível de concentração corresponde a uma diferença no índice de refração entre a amostra e a fase móvel de aproximadamente 10^{-7} unidades de índice de refração. Para observar esta diferença é necessário um controle de temperatura de mais ou menos 0,001°C o que normalmente é conseguido por circulação de água, de uma boa fonte termostatizada, através do refratômetro ou um bom controle da temperatura ambiente. Além deste problema com a temperatura, existem ainda outros: a sensibilidade às variações de vazão e mudanças na composição da fase móvel, que impede o uso de gradientes por ser difícil encontrar um par de solventes com índices de refração idênticos. Qualquer mudança na composição da mistura mudará o índice de refração da fase móvel, então, o lado da referência terá que mudar, o que é quase impossível.

Existem vários modelos deste tipo de detector. Um se fundamenta na lei de Fresnel, segundo a qual na interface entre o prisma de vidro e algum líquido, a quantidade de luz transmitida e refletida é proporcional ao ângulo de incidência da luz e ao índice de refração do líquido. A *Figura IX-15* ilustra o detector do tipo Fresnel. A luz da fonte atravessa um seletor, um filtro de infravermelho, outro seletor, e uma lente. Os seletores e a lente produzem dois raios colimados que entram no prisma e incidem sobre a interface vidro-líquido das celas de referência e amostra, respectivamente. O ajuste grosso e fino do ângulo de incidência nas interfaces é realizado através da rotação do corpo do projetor. As celas de amostra e de referência, de aproximadamente 3 μL cada uma, consistem em cavidades ovaladas, de teflon, presas entre o prisma e atrás de uma placa de aço inoxidável que contém os tubos de entrada e saída. A diferença de intensidade da luz transmitida através das celas está em função dos índices de refração de ambos os líquidos e se determina por meio de um fotodetector duplo, o qual gera um sinal elétrico para ser transmitido para o registrador. A desvantagem do detector tipo Fresnel é que, para cobrir a faixa de índice de refração normal (η = 1,31 a 1,63), são necessários dois prismas.

Um outro tipo de detector por índice de refração é ilustrado esquematicamente na *Figura IX-16*. Neste refratômetro de deflexão a luz emitida pela fonte é limitada pelo seletor, colimada pela lente, e passa através da cela. A cela tem os compartimentos da amostra e referência separados por um pedaço de vidro. Quando a composição da fase móvel muda na cela da amostra, a mudança no índice de refração causa uma deflexão na posição final do raio de luz no fotodetector. Uma luz incidente passa através da cela, ela é deflectada, refletida pelo espelho atrás da cela e, de novo, deflectada. A lente focaliza esta luz deflectada no fotodetector que produz um sinal elétrico proporcional à posição da luz. O sinal é então amplificado e registrado. O detector por deflexão tem a vantagem de possuir uma ampla faixa de linearidade; também necessita somente de um prisma para cobrir toda a faixa de índice de refração e é menos sensível a troca de temperaturas. Por outro lado, é muito sensível a vibração ou movimento do instrumento e suas celas não são tão pequenas (10 a 15 μL) como as do tipo Fresnel. Este último é considerado mais sensível e tem celas de volumes menores; porém, é mais sensível à mudança de temperaturas.

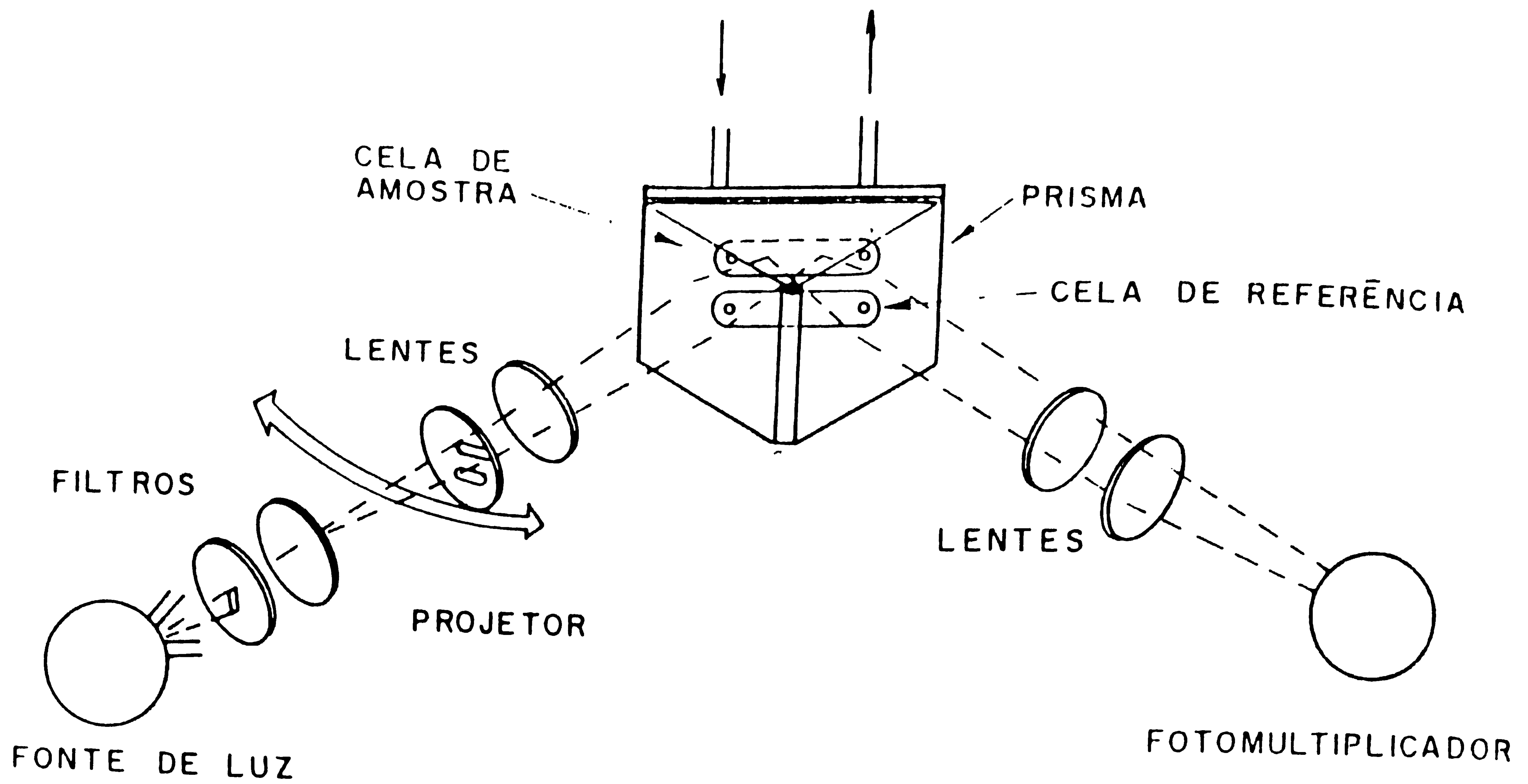



FIGURA IX-15 Esquema de um detector refratométrico do tipo Fresnel.

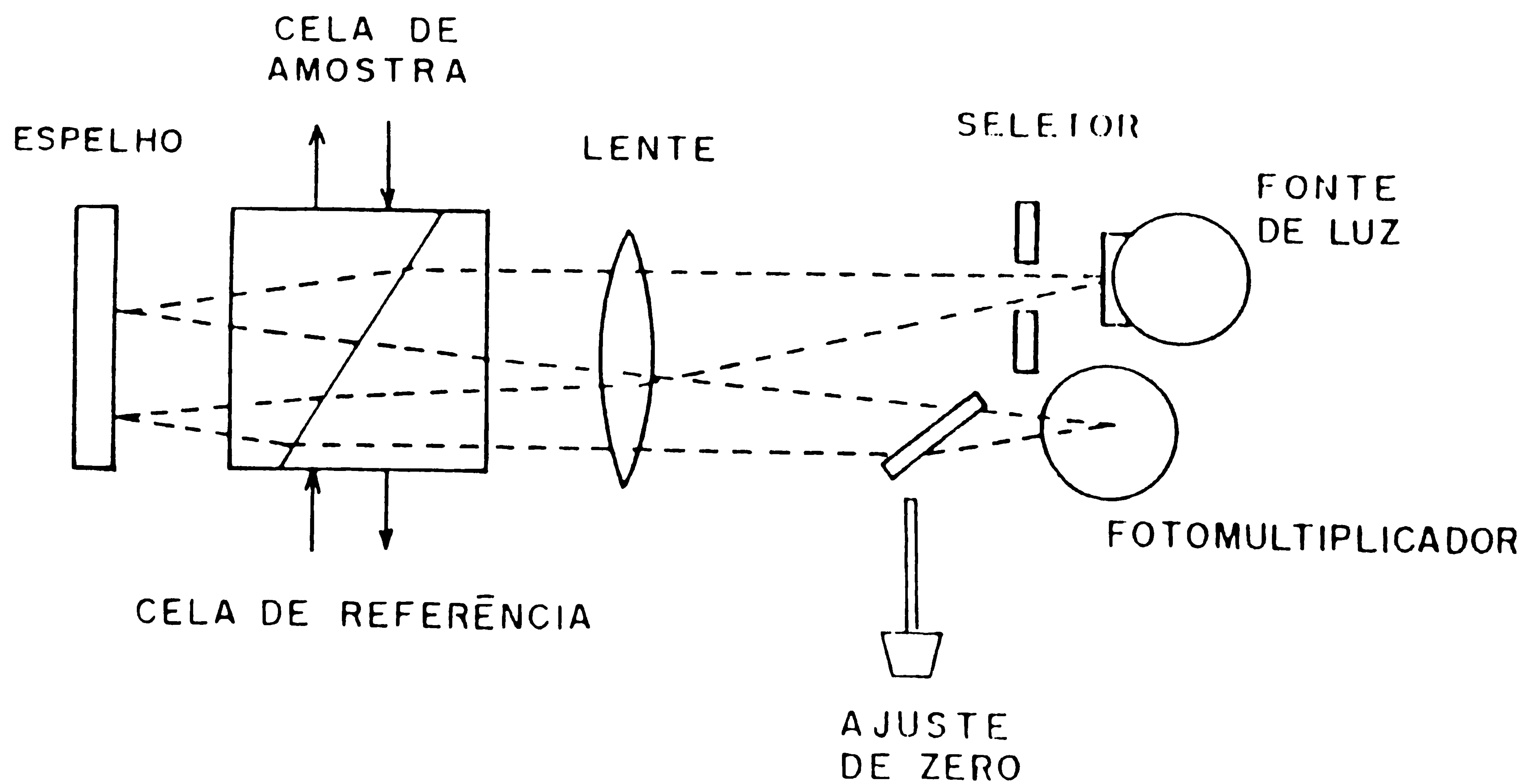



FIGURA IX-16 Esquema de um detector refratométrico por deflexão.

Os detectores por índice de refração não são instrumentos muito estáveis, nem de fácil manipulação, principalmente quando se deseja obter deles o máximo de sensibilidade. Estas pequenas dificuldades têm limitado o seu emprego a dois campos em particular: a cromatografia por exclusão, na qual é comum trabalhar com polímeros, com amostras de interesse biológico ou com amostras que, em geral, não têm

absorvância na região ultravioleta, e a CLAE preparativa, em que é aceitável um detector não muito sensível operando fora das suas melhores condições.

6.6.5. Detectores eletroquímicos

Métodos eletroquímicos de detecção oferecem provavelmente a mais promissora solução para o problema de desenvolvimento de um detector para a CLAE suficientemente sensível e não baseado em absorvância de luz. Eles oferecem as vantagens de alta seletividade, alta sensibilidade e de serem muito bons para as análises de traços. Os detectores polarográficos, usando um eletrodo de mercúrio gotejante, tem recebido a maior atenção atualmente.

É importante destacar que neste tipo de detecção a amostra tem que ser constituída de moléculas ou íons que sofrem ou oxidação ou redução (detectores polarográficos). Este detector é seletivo, porque o polarógrafo normalmente fixa um potencial e passa, neste caso, a detectar somente as espécies que se oxidam (ou reduzem) em um potencial inferior ou igual ao fixado.

Os sensores com eletrodos sólidos têm sido muito pesquisados, mas a permanência de uma área de superfície ativa constante tem sido o maior problema para fins de análises quantitativas.

Os métodos condutométricos, de alta e baixa freqüência, e os potenciométricos têm sido usados para detecção na cromatografia líquida clássica, mas têm recebido pouca atenção na CLAE.

Os detectores eletroquímicos são bons para as modalidades de cromatografia que usam fases móveis aquosas, tais como a cromatografia por troca iônica, por exclusão ou com fase reversa por pares de íons ou até com fase reversa com compostos oxidáveis na fase móvel água- álcool.

6.6.6. Detectores de radioatividade

Os detectores de radioatividade são projetados especificamente para detectar solutos radiomarcados conforme são eluídos da coluna. Quase todos detectores deste tipo não são encontrados comercialmente, com exceção dos que detectam a partícula β^- do ^{32}P e do ^{14}C. Para o segundo, que funciona através de cintilação líquida, há necessidade da adição de um coquetel de cintilação. Detectores radioquímicos têm uma grande faixa de resposta, são insensíveis a troca de fases móveis, podendo então ser usados com eluição por gradiente. Aplicações cromatográficas com emissores de γ ou β^- forte (tais como ^{131}I, ^{210} Po, e ^{125}Sb), usando sistemas de cintilação ou mesmo contador Geiger, têm sido publicadas.

A sensibilidade obtida com os sistemas através de fluxo contínuo é menor do que aquela obtida quando amostras individuais são recolhidas pelo coletor de frações e contadas. A sensibilidade pode ser melhorada pelo aumento do tempo de contagem, mas isto só é conseguido por uma diminuição da vazão da fase móvel ou pelo emprego de celas de maiores volumes, que aumentará o tempo de permanência do soluto na cela de contagem e, conseqüentemente, alargará o pico, o que diminuirá a eficiência cromatográfica. A técnica de parar a vazão possibilita um aumento do tempo de contagem sem prejudicar a separação cromatográfica. Por isto, métodos radioquímicos de detecção são melhores para serem usados com colunas relativamente largas e tempo de análise longo.

6.6.7. Outros detectores

Vários detectores baseados em outras propriedades do soluto (tais como, constante dielétrica, densidade, pressão de vapor, viscosidade, etc.) têm sido apresentados para serem usados na CLAE. Desde que vários destes detectores são baseados em propriedades que dependem da temperatura, eles são limitados, porque sua resposta sofre grande variação com as mudanças da temperatura. Entre os vários outros detectores, alguns começando a ser comercializados e outros em fase de desenvolvimento, talvez possa obter-se o "detector do futuro", que apresentará as características indicadas no início desta seção.

6.7. Registro dos dados

Para registrar ou manipular os dados obtidos pelos detectores na CLAE pode se usar simplesmente um registrador ou, de uma maneira sofisticada, um integrador ou mesmo um microcomputador.

No caso do registrador utiliza-se, normalmente, um potenciométrico de 1 a 10 mV. Sua função é representar em um registro gráfico o sinal elétrico emitido pelo detector. As características importantes destes registradores são resposta rápida da pena e velocidade variável do papel.

Além do tempo de retenção para cada pico, o integrador fornece a área de cada um dos picos e a área total de todos eles, que são dados mais precisos do que a altura ou área dos picos que normalmente é utilizada quando se faz somente o registro.

Para manter ou aumentar a versatilidade, exatidão e precisão da CLAE, um microcomputador pode ser utilizado. Este microcomputador é usado tanto para processar os dados obtidos pelo detector, armazenando e registrando, como para controlar a composição da fase móvel para separações com eluição isocrática ou com gradiente, a vazão que sai da bomba, injeção da amostra, temperatura da coluna, etc.

Uma outra vantagem do microprocessador é que ele monitora continuamente todos os parâmetros da separação e diagnostica problemas, o que facilita muito o serviço do operador.

6.8. Controle da temperatura da coluna e detector

A maioria das análises são realizadas na temperatura ambiente; por isso, muitos equipamentos não dispõem de controle de temperatura da coluna. Somente em certas separações, por exemplo, em cromatografia por troca iônica ou cromatografia por exclusão, é necessário um controle mais preciso; na maior parte dos casos não precisa ser melhor do que ao redor de 2°C.

Para se trabalhar a temperatura superiores a do ambiente, utilizam-se banhos circuladores termostatizados de água ou de outro líquido ou fornos do tipo elétrico.

O controle de temperatura do detector depende do tipo empregado, porque alguns não precisam, enquanto outros necessitam um controle muito minucioso (por exemplo, o detector diferencial de índice de refração). Este controle pode ser feito com banho termostatizado ou com fornos (ou blocos) aquecidos com resistência elétrica.

6.9. Coletor de frações

Uma grande vantagem da CLAE é a facilidade com que se pode coletar os componentes da amostra analisada, mas, para isto, requerem-se detectores que não decompõem ou destruam os componentes já separados.

Existem coletores automáticos como componentes de equipamento ou como acessórios. Alguns dos coletores automáticos são refrigerados para evitar a decomposição das substâncias separadas.

6.10. Determinação da vazão

A determinação da vazão através da coluna na CLAE pode ser realizada por meio de diversas técnicas.

Existem os métodos volumétricos ou gravimétricos, que consistem, respectivamente, em medir ou pesar o volume de fase móvel coletada durante um certo período de tempo. Estes métodos são sensíveis e exatos, mas não são muito rápidos e não dão uma leitura contínua.

Outro tipo de dispositivo é chamado medidor de bolha, que consiste de um tubo de vidro de volume conhecido através do qual se faz a fase móvel deslocar. Para medir a vazão, introduz-se uma bolha e cronometra-se o tempo do seu percurso através do tubo. Este método é rápido, exato e preciso, mas não contínuo.

Existem sistemas de bombas que atingiram um nível de sofisticação que se pode dizer que não há necessidade de medir a vazão da fase móvel, como é o caso da bomba de volume constante controlada por meio de microprocessadores eletrônicos, que recebem a ordem do operador e automaticamente ajustam as condições de operação da bomba para dar a vazão requerida na ordem de comando.

7. APLICAÇÕES DA CLAE

A CLAE nasceu essencialmente como uma técnica de separação mas, com os recursos que ela apresenta atualmente, passou a ocupar um lugar de grande destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa. Os procedimentos que devem ser seguidos para utilizar a CLAE em análises qualitativas e quantitativas são idênticos aos discutidos no Capítulo VIII.

Apesar da CLAE ser uma técnica relativamente nova, já conta com um enorme número de publicações em química e bioquímica que descrevem as mais diversas aplicações. Em vários casos, estas aplicações

consistem em determinações de substâncias cujas análises por outras técnicas são muito difíceis ou demoradas ou mesmo impossíveis.

Os poucos exemplos, entre os vários possíveis hoje, apresentados a seguir deverão dar uma idéia da potencialidade desta técnica analítica.

Um cromatograma dos componentes de um comprimido de analgésico é mostrado na *Figura IX-17*. É grande o interesse na análise qualitativa e quantitativa destes componentes, logo após a fabricação dos comprimidos ou mesmo após decorrer algum tempo, para controlar o problema de estabilidade.

O interesse é grande em saber os níveis e o período de permanência dos anticonvulsivantes no soro sanguíneo de pacientes sob tratamento neurológico. A *Figura IX-18* mostra um cromatograma onde a análise de uma mistura padrão de anticonvulsivantes é feita em alguns minutos.

A *Figura IX-19* mostra a determinação dos esteróides a base de cortisona. Estes produtos são usados como antiinflamatório, antialérgico, anti-reumático, etc. Os esteróides são caracterizados pelos seus numerosos grupos funcionais polares e normalmente são compostos termicamente lábeis. Isto dificulta a sua determinação através da cromatografia gasosa na qual pode ocorrer absorção irreversível e/ou decomposição.

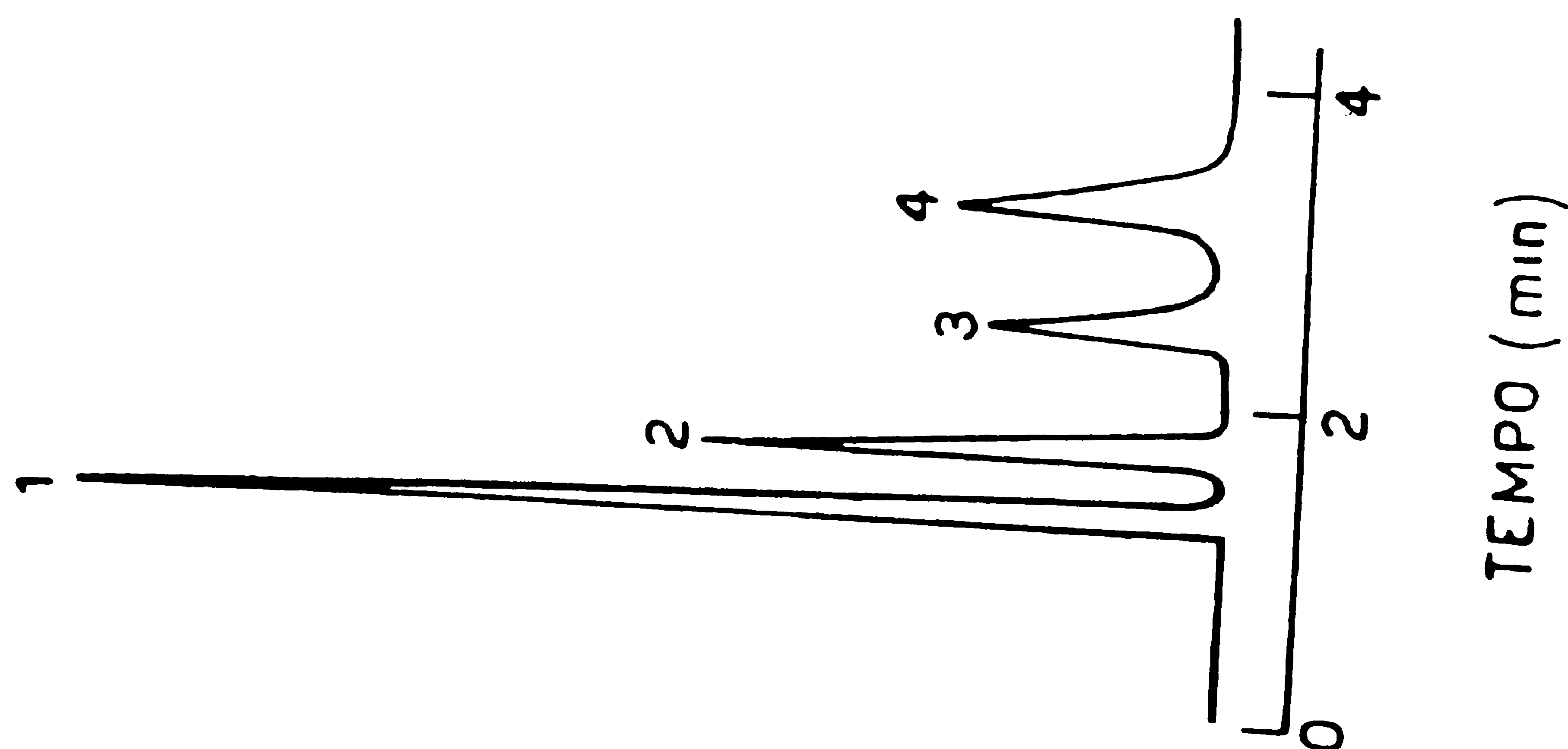



FIGURA IX-17 Separação cromatográfica de alguns analgésicos.
Coluna: μ-Bondapack CN, 100 x 8 mm
Fase móvel: ácido acético 1% em água:metanol (80:20) a 6 mL/min
Detecção: por absorvância no UV (254 nm)
Amostra: 1: acetaminofen; 2: cafeína; 3: salicilamida; 4: aspirina.

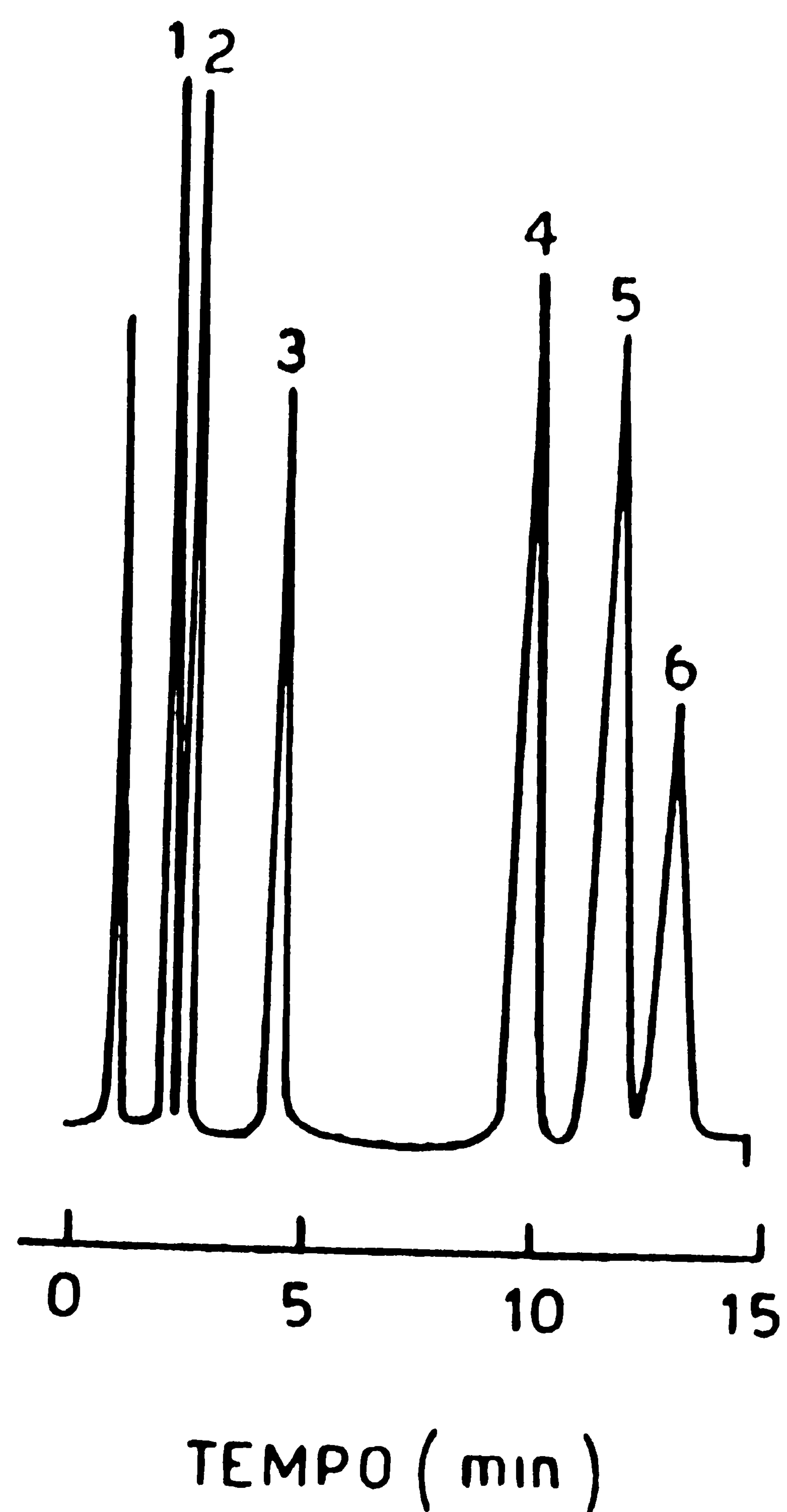



FIGURA IX-18 Separação cromatográfica de alguns anticonvulsivantes.
Coluna: μ-Bondapack C-18, 300 x 4 mm, a 50°C
Fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato (21:79) a 3 mL/min
Detecção: por absorvância no UV
Amostra: 1: etosuximida; 2: primidona; 3: fenobarbital; 4: hexobarbital (PI); 5: difenil-hidantoína; 6: carbamazepina.

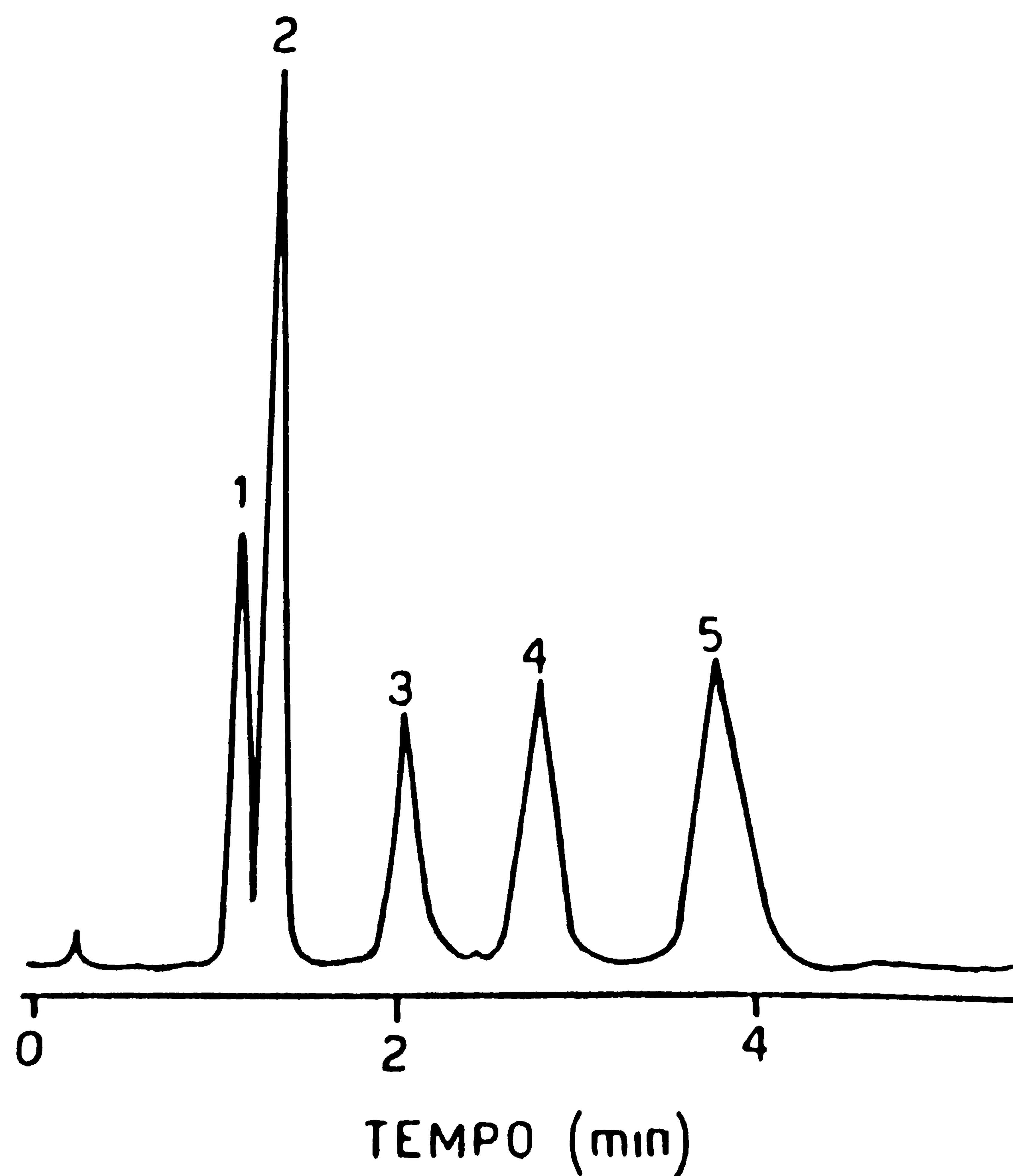



FIGURA IX-19 Separação cromatográfica de alguns esteróides.
Coluna: μ-Bondapack fenil, 100 x 8 mm
Fase móvel: acetonitrila:água (30:70) a 9,9 mL/min
Detecção: por absorvância no UV
Amostra: 1: hidrocortisona; 2: cortisona; 3: corticoesterona; 4: acetato de hidrocortisona; 5: acetato de cortisona.

A análise química dos açúcares do mel, como de outros alimentos, visa a sua caracterização e também o controle de sua qualidade. A *Figura IX-20* mostra uma rápida análise dos açúcares do mel.

A análise de vitaminas por cromatografia gasosa também é muito difícil e requer, geralmente, a formação de derivados voláteis. Em contraste, na CLAE, como indica a *Figura IX-21*, a análise de compostos vitamínicos é possível em um curto intervalo de tempo.

Atualmente é grande o número de problemas relacionados com a contaminação ambiental e a CLAE é muito utilizada na solução destes problemas. Alguns dos pesticidas (inseticidas, larvicidas, herbicidas, etc.) são facilmente determinados através da CLAE. Os inseticidas normalmente contêm ligações conjugadas e assim absorvem fortemente no ultravioleta. A *Figura IX-22* mostra a determinação de cinco inseticidas. A fase estacionária, β, β' -oxidipropionitrila, foi escolhida porque ela apresenta uma boa resolução para compostos polares. Desde que os inseticidas têm polaridades intermediárias, um solvente relativamente apolar foi escolhido como fase móvel.

FIGURA IX-20 Separação cromatográfica dos compostos em mel de abelha.
Coluna: CG sugar a 85°C
Fase móvel: água a 0,4 mL/min
Detecção: por índice de refração a 45°C
Amostra: 1: sacarose; 2: glicose; 3: frutose

1
2
3
4
0 2 4 6
TEMPO (min)

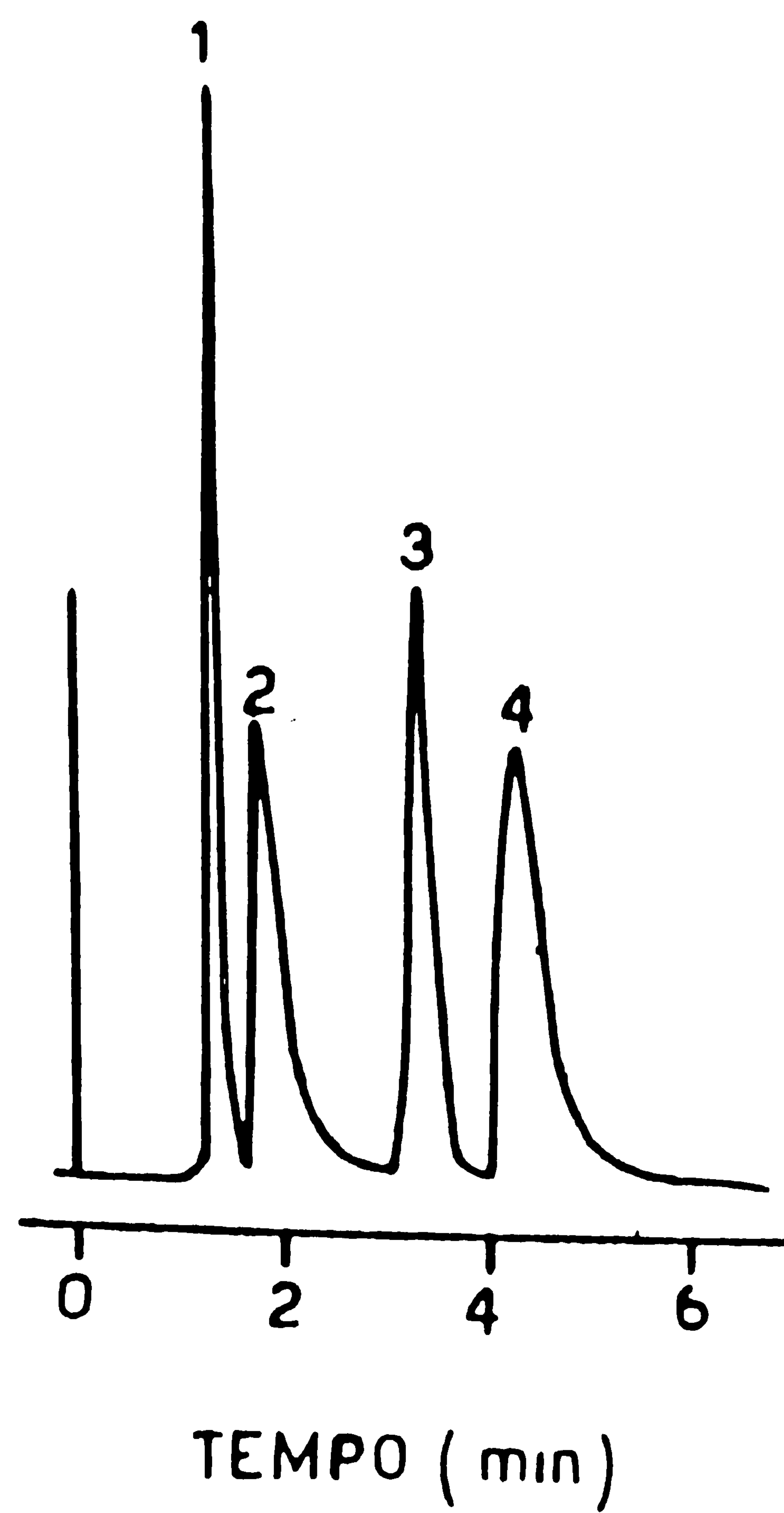



FIGURA IX-21 Separação cromatográfica de algumas vitaminas solúveis em água.
Coluna: CG-FQL-NPG, 5 μm
Fase móvel: água a 1,0 mL/min
Detecção: por absorvância no UV (254 nm)
Amostra: 1: vitamina C; 2: vitamina B6; 3: vitamina B12; 4: vitamina B1

4
2
3
5
1
0 2 4 6 8
TEMPO (min)

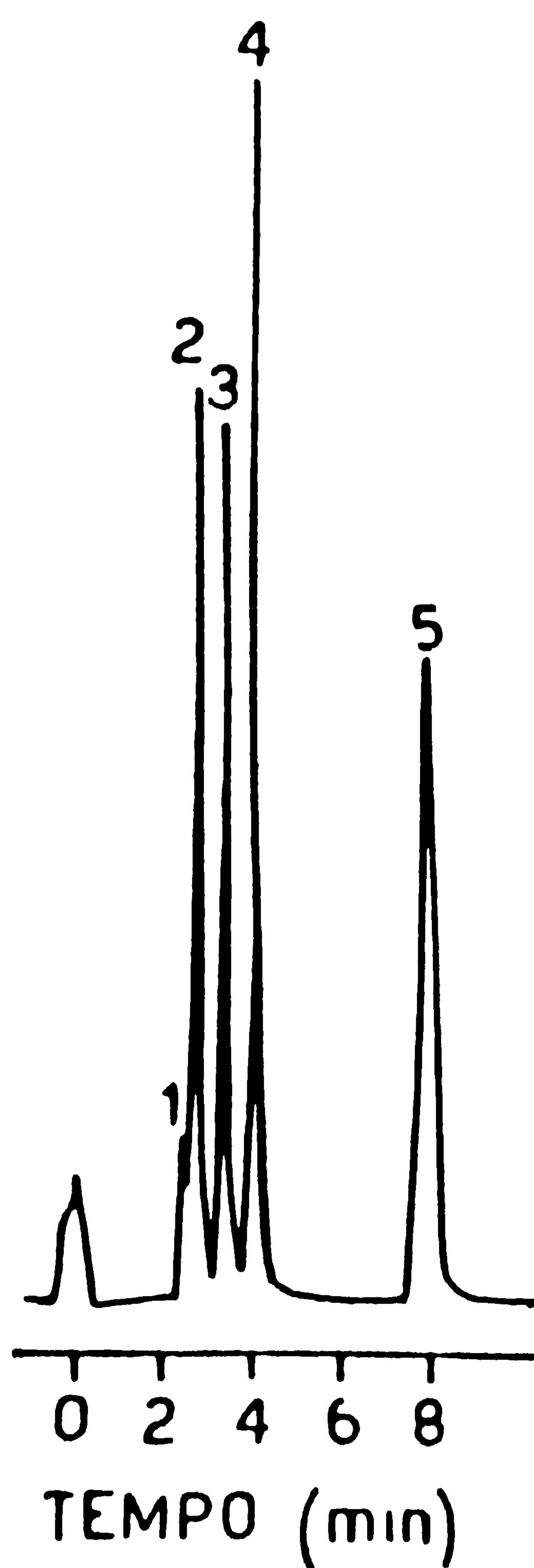



FIGURA IX-22 Separação cromatográfica de alguns inseticidas.
Coluna: β,β'-oxidipropionitrila sobre Zipax, 160 x 2,1 mm
Fase móvel: isooctano a 1,7 mL/min
Detecção: por absorvância no UV
Amostra: 1: DDT; 2: trithion; 3: methoxicloro; 4: parathion; 5: metil parathion

Uma outra classe de compostos que são contaminantes ambientais atmosféricos, muito importantes, são os policíclicos aromáticos. A sua determinação pode ser feita através de CLAE, como mostra a *Figura IX-23*. Esta mesma análise por meio de cromatografia gasosa requer condições de altas temperaturas.

Nos cromatogramas da *Figura IX-24*, onde mostra a determinação do HMX e RDX, substâncias explosivas, pode-se notar que a resposta do detector para o RDX, a 254 nm, é um pouco superior à do HMX enquanto, a 230 nm, é bem inferior. Isto indica que RDX absorve com a mesma intensidade do que o HMX no comprimento de onda de 254 nm, mas, em 230 nm, a sua absorvância diminui em relação ao HMX.

Devido ao rápido crescimento na produção de açúcar, álcool e derivados, a partir da cana, é de grande importância a análise da sua matéria-prima, o caldo-de-cana O cromatograma da *Figura IX-25* dá condições de determinar rapidamente a percentagem relativa dos principais componentes do caldo-de-cana.

Para compostos com alta massa molecular o método a ser seguido é a CLAE por exclusão. Pode-se também combinar duas ou mais técnicas cromatográficas para as separações mais difíceis. Por exemplo, inicialmente faz-se a separação baseada na massa molecular (tamanho) dos componentes da mistura e, depois, em cada uma das frações obtidas faz-se uma separação por adsorção ou partição, obtendo-se os compostos puros. Para amostras muito complexas podem-se usar várias colunas em série.

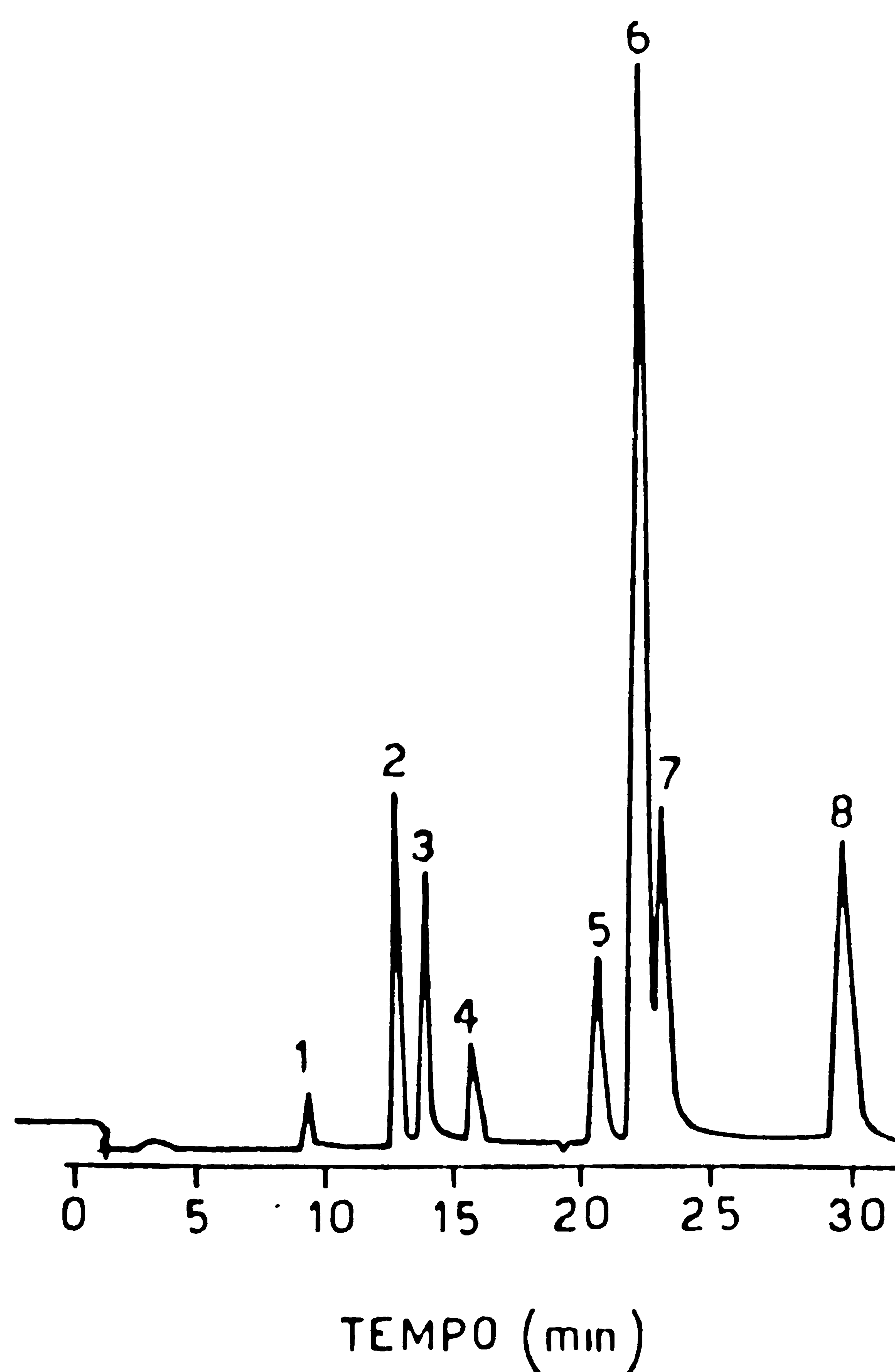



FIGURA IX-23 Separação cromatográfica de alguns compostos policíclicos aromáticos
Coluna: RP-R, 5 μm, 250 x 4,6 nm a 25°C
Fase móvel: acetonitrila:água (82:18) a 0,5 mL/min
Detecção: por fluorescência (excitação em 280 nm, emissão em 389 nm)
Amostra: 1: desconhecido; 2: fluoranteno; 3: pireno; 4: criseno; 5: perileno + benzo(e) pireno; 6: benzo(a) pireno; 7: di-benzo(ac) antraceno; 8: benzo(glu) perileno.

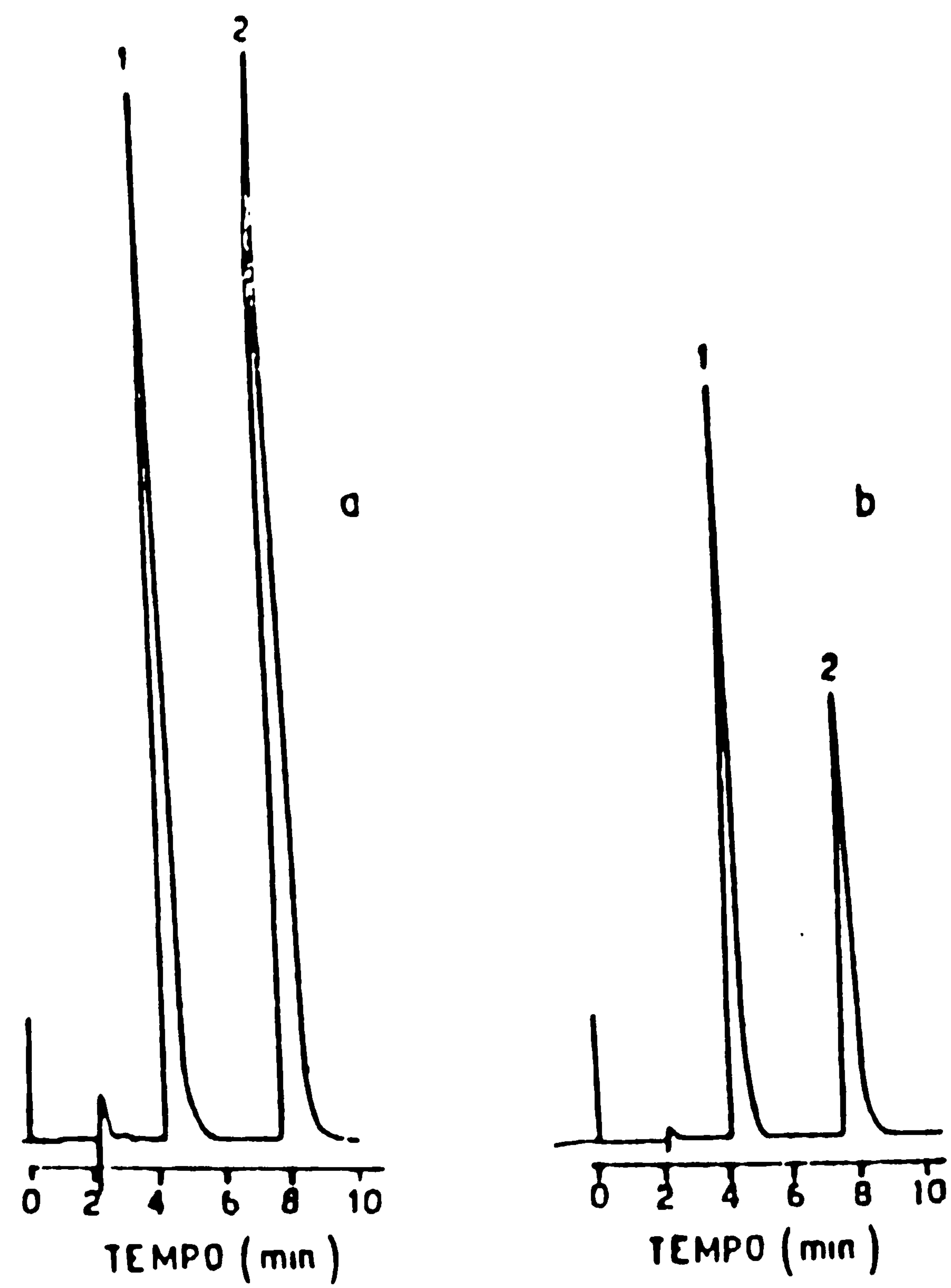



FIGURA IX-24 Separação cromatográfica dos explosivos HMX (1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraciclooctano) e RDX (1,3,5-trinitro-1,3,5-triciclohexano)
Coluna: CG-FQL-18 a 40°C
Fase móvel: metanol:água a 1,0 mL/min
Detecção: por absorvância no UV. a: 254 nm; b: 230 nm
Amostra: 1: HMX; 2: RDX

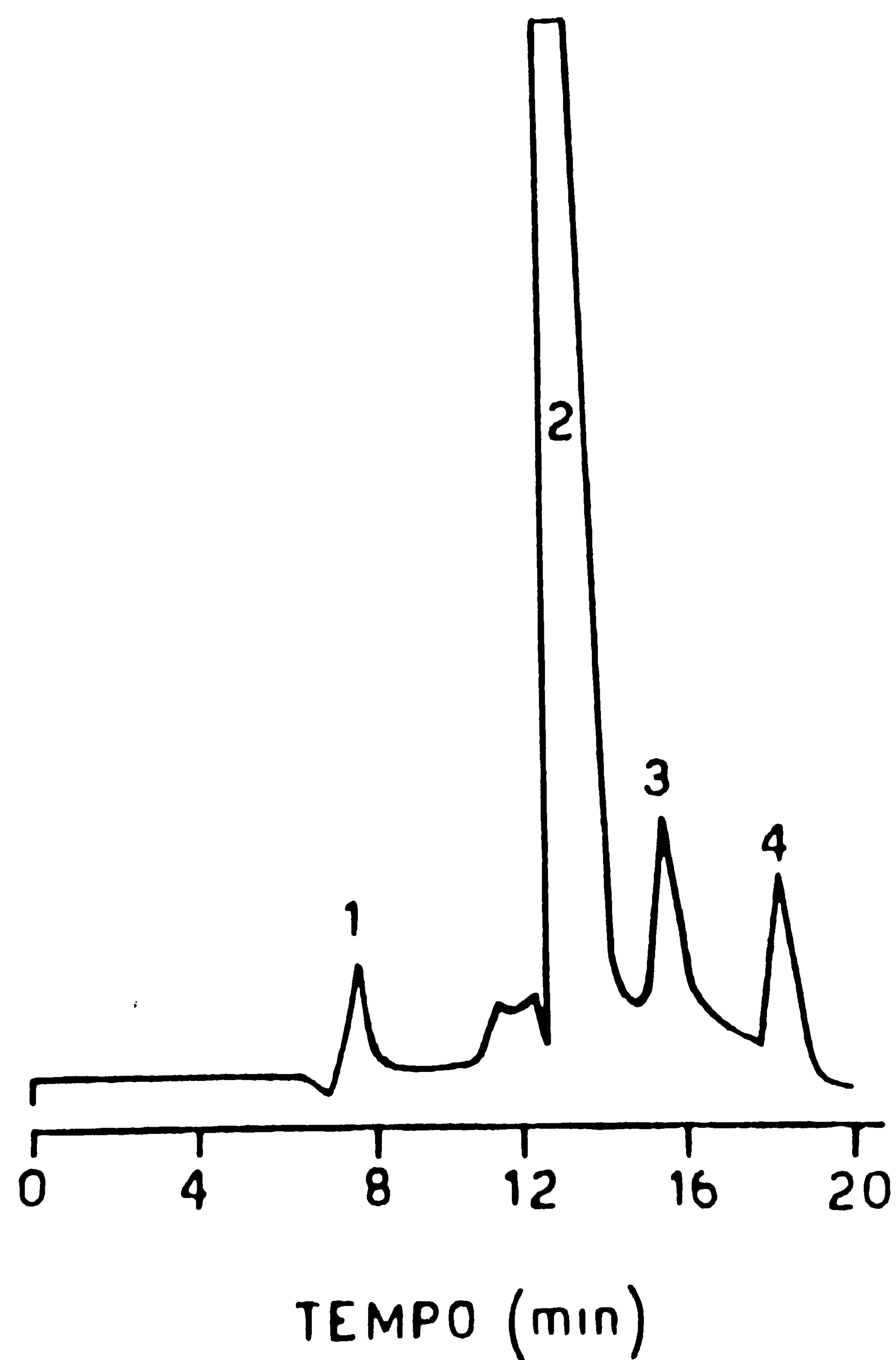



FIGURA IX-25 Separação cromatográfica de alguns constituintes de caldo de cana.
Coluna: CG 410-IR a 85°C
Fase móvel: água a 0,4 mL/min
Detecção: por índice de refração
Amostra: 1: dextrano; 2: sacarose; 3: glicose; 4: frutose

Na determinação da distribuição de massas moleculares de polímeros e na investigação de produtos naturais, com separações efetuadas de acordo com a massa molecular, a CLAE por exclusão é a mais indicada. Na *Figura IX-26* é mostrada a determinação das massas moleculares em polímeros.

As análises de misturas bioquímicas de moléculas pequenas, usando CLAE por troca iônica, são agora um campo bem estabelecido. Aminoácidos podem ser determinados rapidamente pela CLAE, o que não acontece com a cromatografia líquida clássica. A *Figura IX-27* mostra a separação dos aminoácidos constituintes de um hidrolisado protéico, usando a CLAE por troca catiônica acoplada a um reator pós-coluna, onde se realiza a reação com ninidrina, e a um detector por absorvância no visível.

Nestes exemplos foram enfatizados o aspecto analítico da CLAE, em que as informações obtidas das amostras eram qualitativas e/ ou quantitativas. Por outro lado, o aspecto preparativo da CLAE, como uma técnica conveniente e efetiva para se isolarem quantidades relativamente grandes dos componentes a serem purificados, é de interesse na purificação de materiais em grande escala para usá-los como padrão, ou como intermediários de sínteses, ou, ainda, como materiais extraídos de produtos naturais para ensaios biológicos. Uma interessante separação de compostos um pouco complexos é ilustrado na *Figura IX-28*. O cromatograma *a* é uma separação analítica de intermediários na síntese de vitamina B-12 com uma coluna de adsorvente pelicular de sílica, com partículas de aproximadamente 50 μm. O cromatograma *b* é uma separação preparativa em uma coluna de sílica porosa, com partículas de aproximadamente 60 μm, e uma fase móvel similar. Foi usada uma baixa vazão para a fase móvel, para se isolarem quantidades em níveis de gramas dos componentes, em uma longa coluna de partículas relativamente grandes, resultando em um tempo de separação relativamente longo. A separação muito rápida destes componentes, com resolução equivalente, pode ser esperada com uma coluna de partículas menores (por exemplo, 10μm).

1

3

2

0 60 120 180

TEMPO (min)

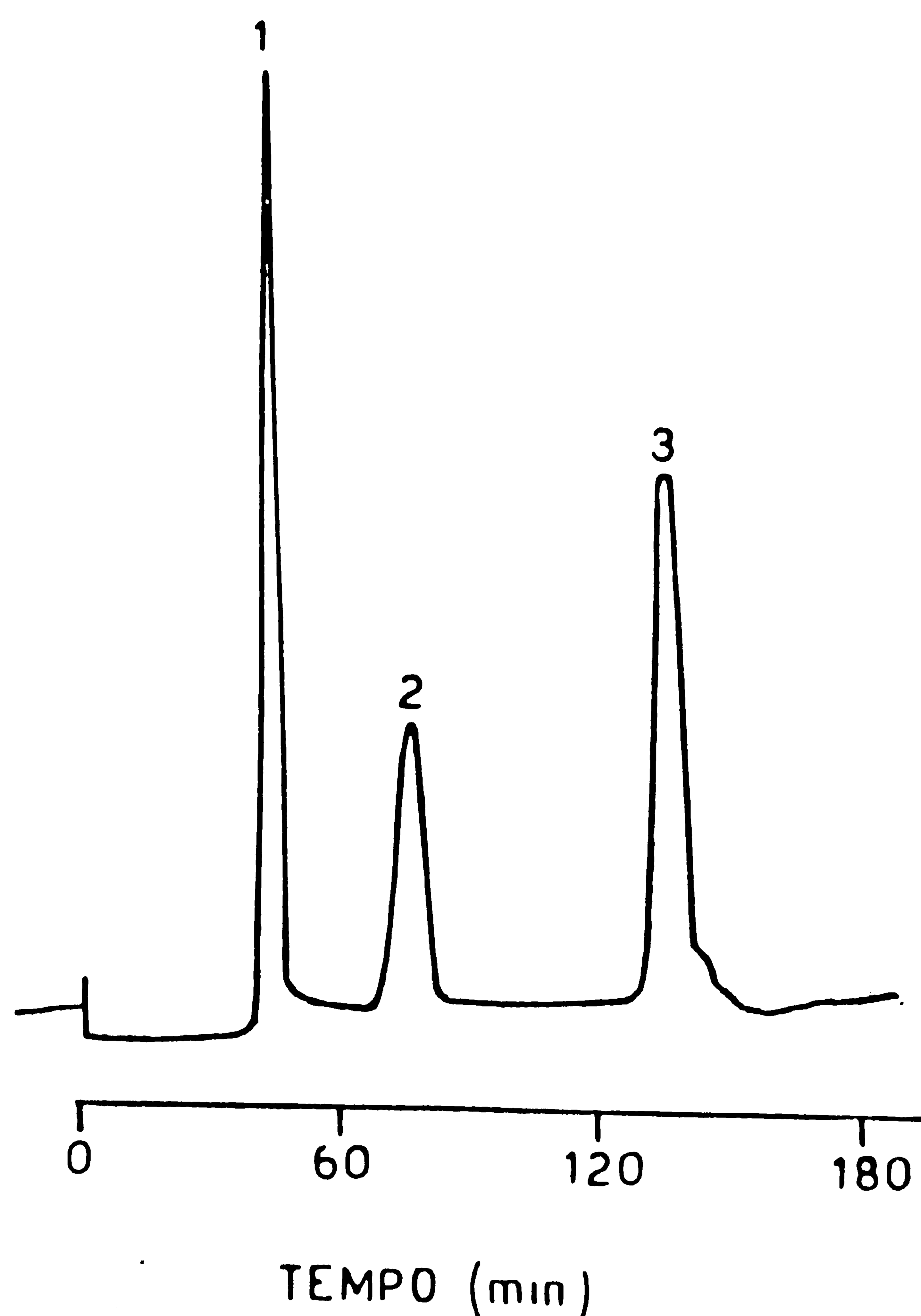
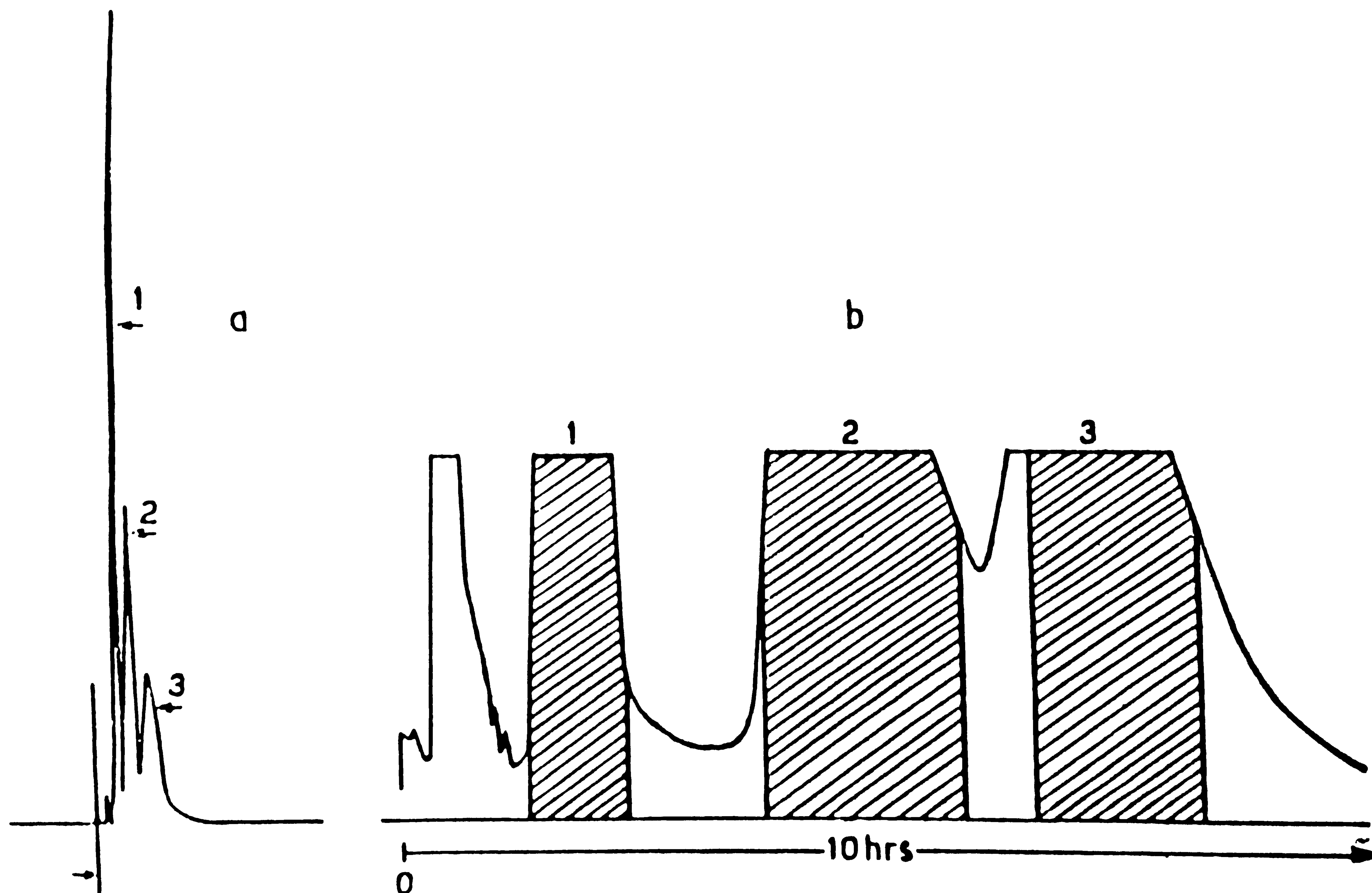



FIGURA IX-26 Separação cromatográfica de uma mistura de poliestirenos.
Coluna: CPG-10, 37μm, 550 x 2,1 mm
Fase móvel: tetrahidrofurano a 0,1 mL/min
Detecção: por índice de refração
Massas moleculares: 1: 1.800.000; 2: 91.800; 3: 4.500

FIGURA IX-28 Separações analítica (a) e preparativa (b) de intermediários da vitamina B12.
Colunas: a: Corasil II, 37-50 μm, 1800 x 2 mm
b: Sílica Woelm, 37-80 μm, 240 x 2,3 cm
Fase móvel: hexano:isopropanol:metanol (5:2:1)
Vazão: a: 1,2 mL/min; b: 34 mL/min
Amostra: 1: cobester; 2: amidas; 3: amida

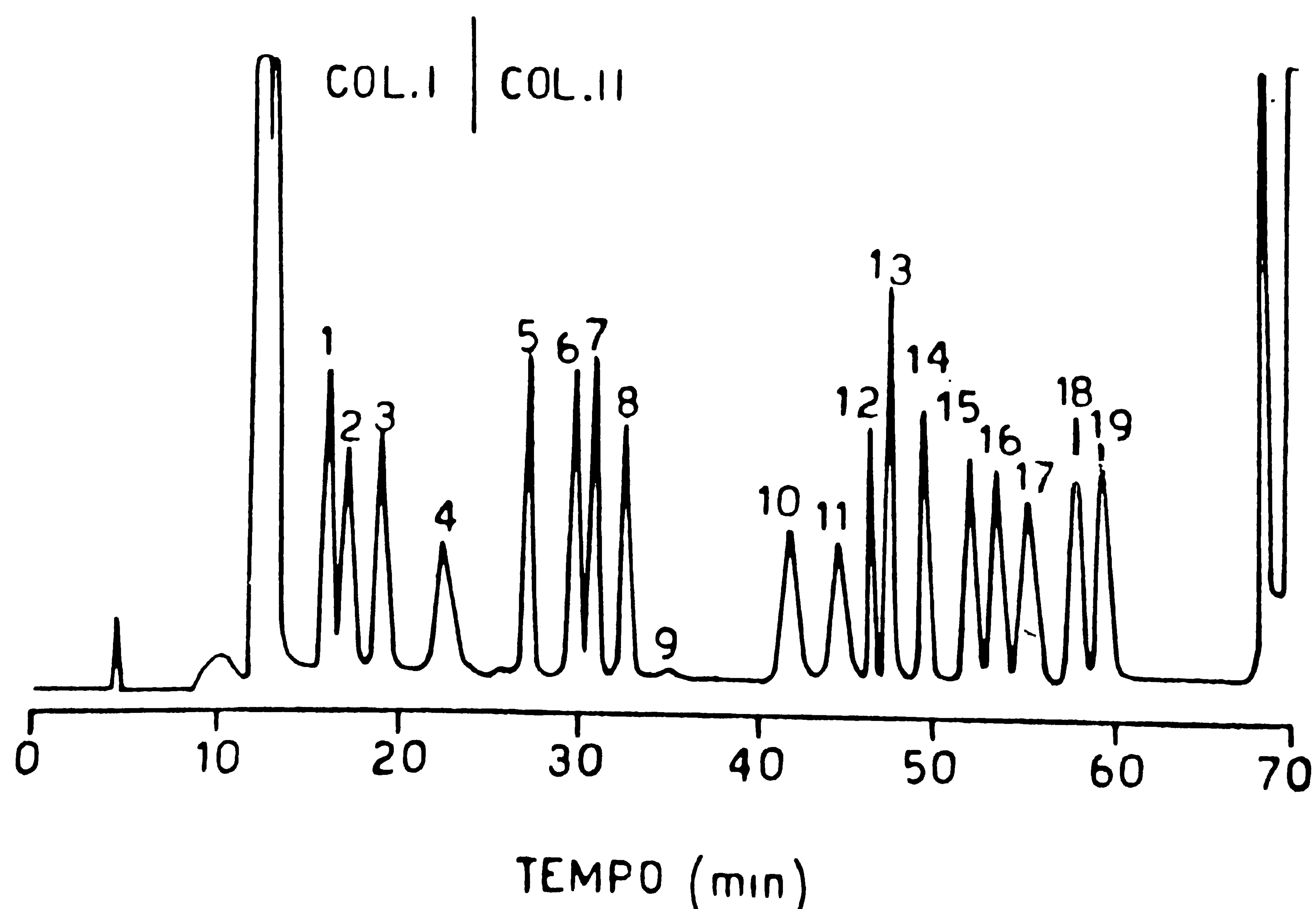
FIGURA IX-27 Separação cromatográfica de aminoácidos.
Colunas: resina de troca catiônica forte, 10 μm, a 65°C Coluna I = 40 x 4 mm; coluna II = 220 x 5 mm
Fase móvel: gradiente com tampão de citrato a 0,5 mL/min
Detecção: por absorvância no visível (570 nm) após reação pós-coluna com ninidrina
Amostra: 1: lisina; 2: histidina; 3: amônia; 4: arginina; 5: ác. aspártico; 6: treonina; 7: serina; 8: ác. glutâmico; 9: prolina; 10: glicina: 11: alanina; 12: cisteína; 13: valina; 14: metionina; 15: isoleucina; 16: leucina; 17: norleucina; 18: tirosina; 19: fenilalanina.

8. REFERÊNCIAS

- BRAITHWAITE, A. e SMITH, F.J. *Chromatographic Methods*, Chapman and Hall, London, 1985.
- BROWN, P.R. *High Pressure Liquid Chromatography: Biochemical and Biomedical Applications*, Academic Press, New York, 1973.
- CHARALAMBONS, G. *Liquid Chromatographic Analysis of Foods and Beverages*, vol. I, Academic Press, New York, 1979.
- COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.F.; VALENTE, A.L.P.; MURTA, A.L.M. e McNAIR, H.M. *Quím. Nova*, *6*, 46 (1983).
- JOHNSON, E.L. e STEVENSON, R. *Basic Liquid Chromatography*, 2ª edição, Varian Associates, Palo Alto, 1978.
- KIRKLAND, J.J. Ed. *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, New York, 1971.
- MANFREDI, J.F.; COLLINS, C.H. e VALENTE, A.L.P. *Quím. Nova*, *7*, 132 (1984).
- McNAIR, H.M. e ESQUIVEL, B.H. *Cromatografia Liquida de Alta Pressión*, 2ª edição, Organization of American States, Washington, 1980.
- PARRIS, N.A. *Instrumental Liquid Chromatography: A Pratical Manual*, Elsevier, New York, 1978.
- POOLE, C.F. e SCHUETTE, S.A. *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdan, 1984.
- SIMPSON, C.F. ed. *E Practical High Performance Liquid Chromatography*, Heyden, New York, 1976.
- SNYDER, L.R. e KIRKLAND, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- VALENTE, A.L.P.; COLLINS, C.H. e MANFREDI, J.F. Quím. Nova, *6*, 103 (1983).
- YOST, R.W.; ETTRE, L.S. e CONLON, R.D. *Practical Liquid Chromatography - An Introduction*, Perkin Elmer, Norwalk, 1980.

COL.I | COL.II

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

0 10 20 30 40 50 60 70

TEMPO (min)

CAPÍTULO X

PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

Neste capítulo serão apresentadas algumas experiências relacionadas aos diferentes tipos de cromatografia discutidos nos capítulos anteriores. As primeiras são simples e possíveis de serem aplicadas em laboratórios sem grandes disponibilidades instrumentais. As experiências relacionadas com cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência são mais complexas, pois exigem um equipamento próprio e específico, de custo elevado.

Durante a fase de elaboração deste capítulo procurou-se optar por experimentos de carater didático para aumentar o interesse de alunos que utilizarão o presente livro.

O leitor interessado em outras experiências, principalmente para aplicação em cursos, poderá recorrer à literatura de cromatografia, e principalmente ao Journal of Chemical Education.

1. CROMATOGRAFIA EM PAPEL

1.1. Separação de ânions

1.1.1. Materiais

Preparar as soluções padrões: cloreto de sódio 3% (p/v), brometo de potássio 2% (p/v) e iodeto de potássio 2% (p/v).

Preparar a fase móvel: acetona/água (5:1).

Preparar o agente revelador: solução de nitrato de prata 1,57% (p/v).

Cortar várias tiras de papel Whatman nº 1, como mostra a *Figura X-1.*

Utilizar tubos de ensaio (20 x 2,5 cm) como cubas cromatográficas.

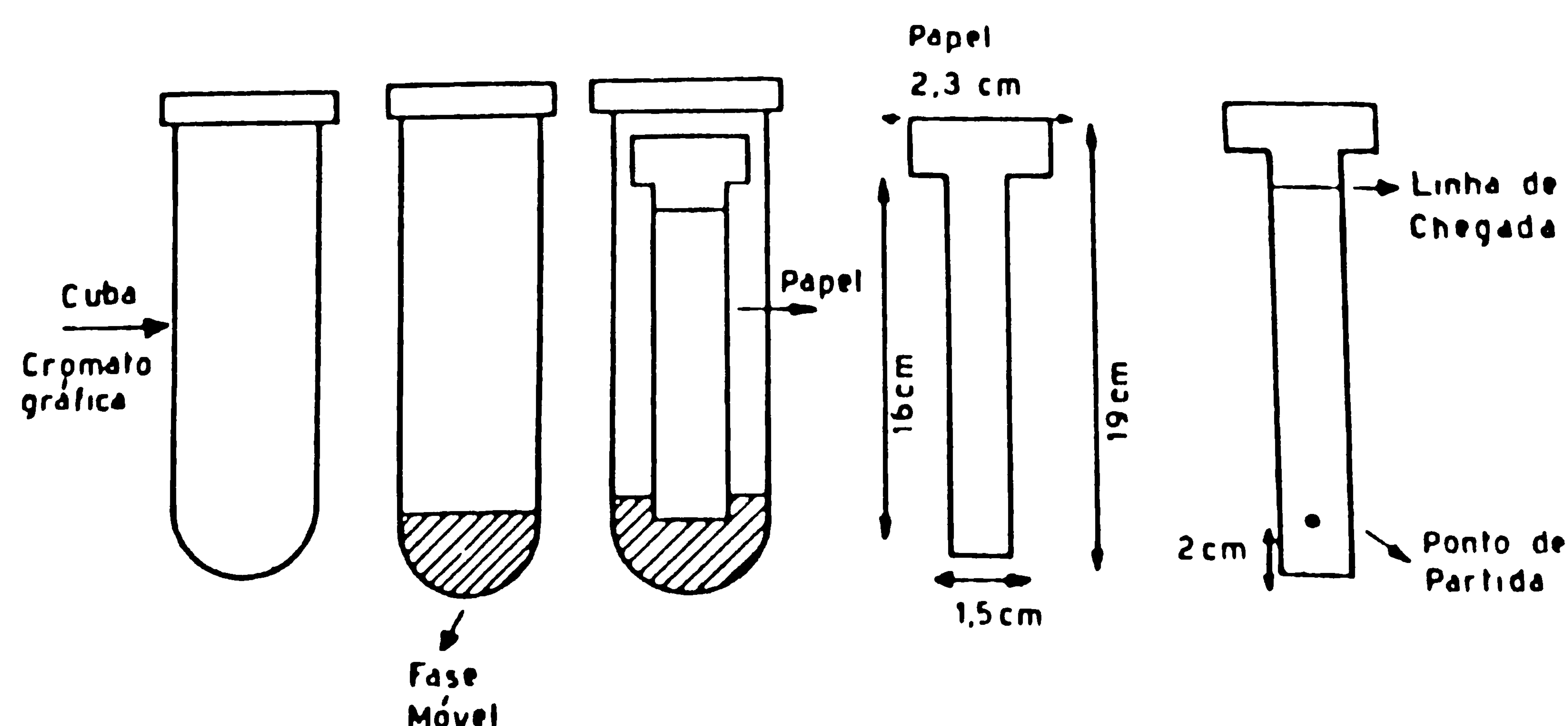



FIGURA X-1 Esquema para a cromatografia em papel.

1.1.2. Desenvolvimento

Colocar 2 mL da fase móvel em 4 tubos de ensaio.

Colocar 1 gota da solução de cloreto de sódio no papel. Esta gota não pode ter mais que 0,5 cm de diâmetro no ponto de partida. Repetir esta operação em dois outros papéis com as soluções de brometo e iodeto. Feito isto, trabalhar com as três soluções em mistura, tendo o cuidado de colocar uma solução por vez, secar a gota para depois colocar a próxima na mesma tira de papel.

Introduzir as tiras de papel nos tubos, de modo que a extremidade inferior mergulhe na fase móvel, e tampar.

Quando a fase móvel atingir a linha de chegada, remover as tiras dos tubos e deixar secar ao ar.

1.1.3. Revelação

Quando a tira estiver seca, umideça-a ou borrife-a com a solução de nitrato de prata. Medir os valores de R_f para cada ânion.

1.2. Separação de cátions

1.2.1. Materiais

Preparar soluções padrões dos seguintes cátions: estanho, antimônio, arsênio, cobre, mercúrio, bismuto, níquel e tálio, pesando uma quantidade da substância que contenha 0,1 g do cátion. Transferir para tubos de ensaio e adicionar 0,2 g de clorato de potássio e 2 mL de ácido clorídrico concentrado. Submeter as misturas a aquecimento em banho-maria por 15 minutos. Filtrar as soluções, ainda quente, em papel de filtro qualitativo e completar os volumes a 10 mL com ácido clorídrico 5M.

Preparar a fase móvel: n-butanol saturado com ácido clorídrico 3M (150:60).

Preparar os agentes reveladores:

A: Alizarina - solução saturada de alizarina em etanol.

B: Ditizona - Ditizona 0,1% (p/v) em clorofórmio.

C: Iodeto de potássio 10% (p/v) em água.

Cortar duas tiras de papel Whatman nº 1 com dimensões que permitam a colocação da mistura dos cátions, bem como de cada um deles individualmente, em cada tira.

Utilizar duas cubas cromatográfica que possam receber os papéis nas dimensões cortadas.

1.2.2. Desenvolvimento

Colocar na cuba cromatográfica uma quantidade de fase móvel suficiente para ter 1,5 cm de altura.

Em um mesmo papel, colocar uma gota da solução de cada cátion, bem como a mistura de todos eles. Repetir o mesmo procedimento na segunda tira de papel.

Introduzir os papéis nas cubas, tomando cuidado para que a fase móvel não toque o ponto de partida, e deixar ocorrer o desenvolvimento.

Quando a fase móvel atingir a linha de chegada, retire os papéis e seque-os com o ar quente de um secador de cabelos.

1.2.3. Revelação

Para a perfeita identificação deste grupo de cátions será necessário a revelação dos dois papéis, contendo a mesma seqüência de cátions, com reveladores diferentes. Um dos papéis é borrifado com o agente revelador A e colocado no interior de uma cuba previamente saturada com vapor de amônia. Observar os resultados. A seguir o mesmo papel é borrifado com o agente revelador B. Observar e anotar os resultados. O outro papel é borrifado com o agente revelador C. Observar e anotar os resultados.

Relatar os valores de R_f desenvolvidos pela fase móvel n-butanol/ácido clorídrico 3M e as cores apresentadas pelos cátions depois de borrifados com os agentes reveladores A, B e C.

2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

2.1. Separação de derivados cumarínicos

2.1.1. Materiais

Preparar soluções etanólicas, 0,1% (p/v): 7-hidroxi-4-metilcumarina, 7-metoxi-4-metilcumarina, 7-aliloxi-4-metilcumarina e 7-acetoxi-4-metilcumarina.

Preparar a fase móvel: n-hexano/acetato de etila (7:3).

Utilizar uma placa de vidro (10 x 20 cm), recoberta com sílica gel G.

Usar uma cuba cromatográfica que possa receber a placa a ser usada.

2.1.2. Desenvolvimento

Colocar na cuba cromatográfica uma quantidade de fase móvel suficiente para ter 1,5 cm de altura.

Preparar a placa colocando 1 gota de cada solução amostra, bem como a mistura de todas as substâncias, no ponto de partida da placa. Introduzi-la dentro da cuba e esperar até que a fase móvel atinja a linha de chegada. Retirar a placa e secá-la.

2.1.3. Revelação

Quando a placa estiver seca, os derivados cumarínicos podem ser observados através da incidência de luz ultravioleta, uma vez que quando excitados são fluorescentes. A ordem de aparecimento considerando os valores crescentes de R_f será: 7-hidroxi-, 7-acetoxi-, 7-metoxi- e 7-aliloxi-4-metilcumarina.

A revelação também pode ser feita em uma cuba cromatográfica contendo vapor de iodo (obtido de alguns poucos cristais de iodo sólido no fundo da cuba). A ordem de aparecimento das manchas é a mesma.

2.2. Separação de nitrofenóis

2.2.1. Materiais

Preparar soluções etanólicas 0,1% (p/v): 4-nitrofenol, 2-nitrofenol, 3-nitrofenol e 2,4-dinitrofenol.

Preparar a fase móvel: n-hexano/acetato de etila (7:3).

Preparar o agente revelador: uma solução aquosa de permanganato de potássio 5% (p/v).

Utilizar uma placa de vidro de 10 x 20 cm recoberta com sílica gel G.

2.2.2. Desenvolvimento

Seguir as indicações da seção 2.1.2.

2.2.3. Revelação

Secar a placa utilizando um secador de cabelos, e a seguir, borrifá-la com o agente revelador. As manchas aparecerão com coloração amarela contra um fundo lilás, à temperatura ambiente.

As substâncias serão observadas na seguinte ordem crescente de valores de R_f: 2,4-dinitro-, 4-nitro-, 3-nitro- e 2-nitrofenol.

2.3. Separação de corantes

2.3.1. Materiais

Preparar soluções etanólicas 0,1% (p/v): eritrosina (ou fluoresceína), verde de malaquita e azul de metileno.

Preparar a fase móvel: acetona/ácido acético/etanol (2:1:1).

Utilizar uma placa de vidro de 10 x 20 cm recoberta com sílica gel G.

2.3.2. Desenvolvimento

Seguir as indicações da seção 2.1.2.

2.3.3. Revelação

Como as substâncias já são coloridas, não se faz necessário o uso de reveladores. As substâncias serão observadas na seguinte ordem crescente de valores de R_f: azul de metileno, verde de malaquita e eritrosina ou fluoresceína.

2.4. Separação de nitroanilinas

2.4.1. Materiais

Preparar soluções 0,1M em benzeno: 2-nitroanilina, 3-nitroanilina e 4-nitroanilina.

Preparar a fase móvel: etanol 2% em benzeno.

Utilizar uma placa de vidro de 10 x 20 cm, recoberta com alumina neutra.

2.4.2. Desenvolvimento

Seguir as indicações da seção 2.1.2.

2.4.3. Revelação

Apesar das substâncias já serem coloridas, as cores podem ser intensificadas, borrifando-se a placa com uma solução aquosa de hidróxido de sódio.

As substâncias apresentarão a seguinte seqüência crescente de valores de R_f : 4-nitro-, 3-nitro- e 2-nitroanilina.

2.5. Separação de aminoácidos

2.5.1. Materiais

Preparar soluções aquosas, 0,1% (p/v): alanina, leucina, serina e valina.

Preparar, em um funil de separação, a mistura n-butanol/ácido acético/água (4:5:1), utilizando a fase superior como fase móvel.

Preparar o agente revelador: ninidrina 0,2% (p/v) em acetona, onde serão adicionadas algumas gotas de piridina um pouco antes de utilizar a solução.

Utilizar uma placa de vidro de 10 x 20 cm, recoberta com celulose.

2.5.2. Desenvolvimento

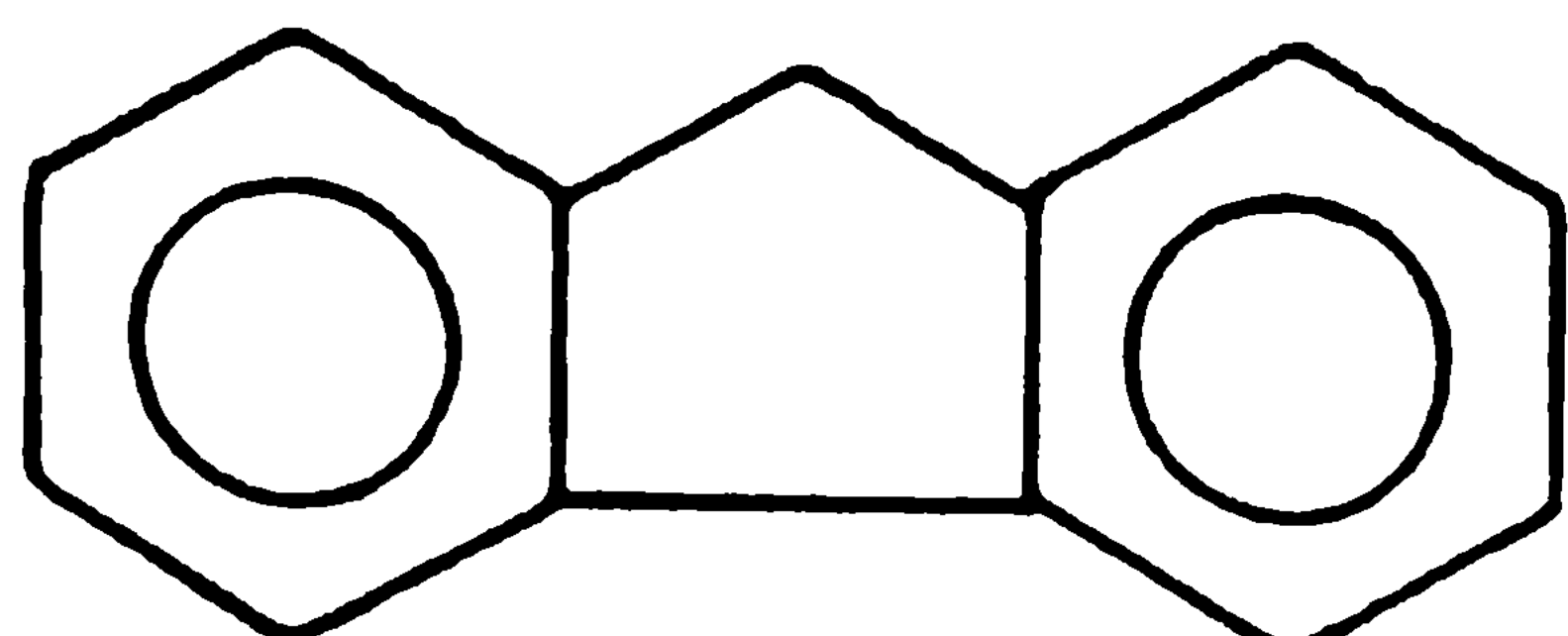
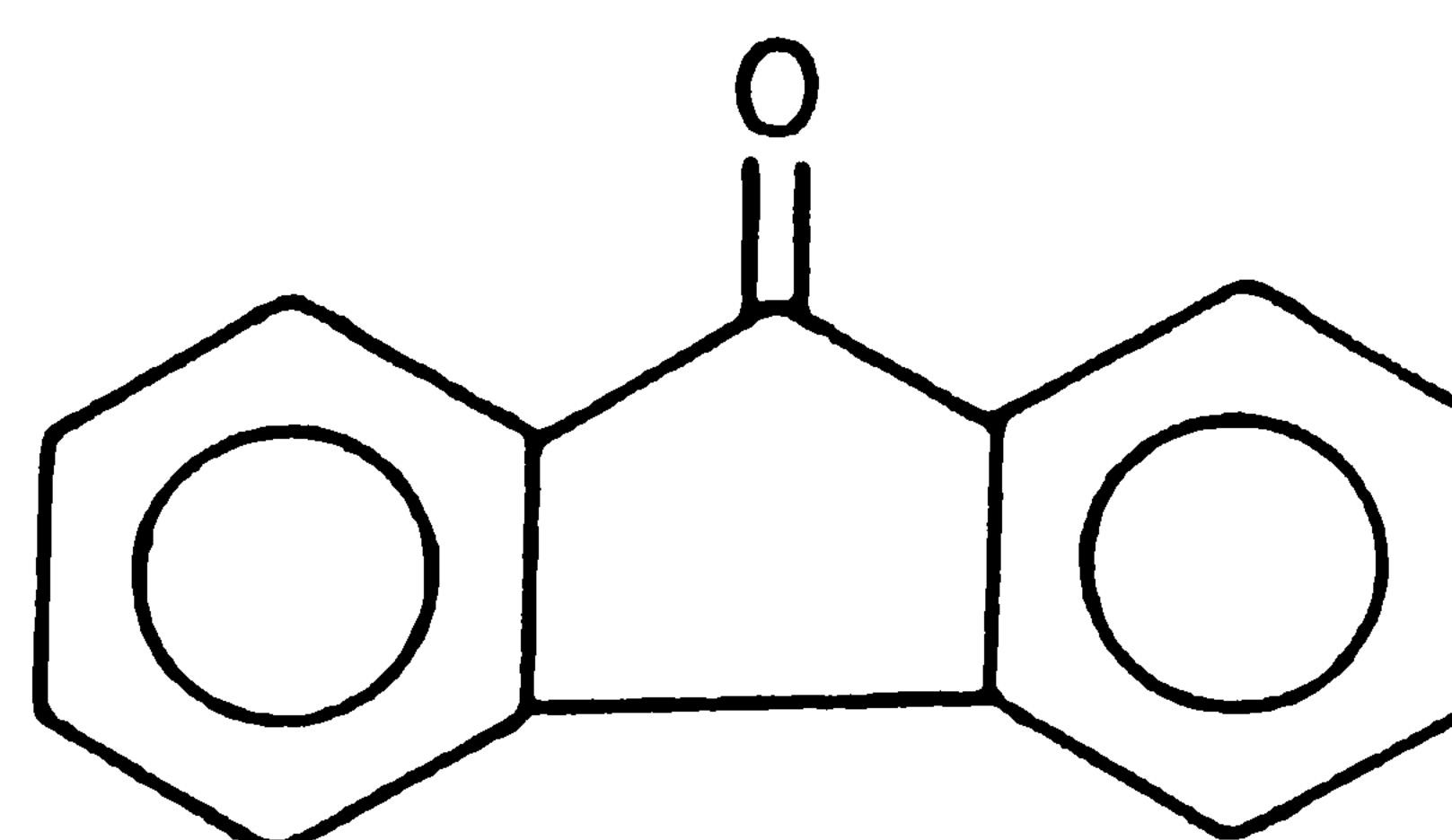
Seguir as indicações da seção 2.1.2.

2.5.3. Revelação

Secar a placa utilizando um secador de cabelos, e a seguir, borrifá-la com a solução de ninidrina 0,2% em acetona, contendo algumas gotas de piridina. A seguir, aquecer a placa a 105°C. As manchas aparecerão coloridas após cinco minutos de aquecimento, ou após algumas horas, à temperatura ambiente.

Os aminoácidos aparecerão, após a revelação, como manchas púrpuras na seguinte ordem crescente de valores de R_f : serina, alanina, valina e leucina.

3. CROMATOGRAFIA POR ADSORÇÃO

3.1. Separação de fluoreno (1) e fluorenona (2).

1

2

3.1.1. Materiais

Preparar uma solução contendo 100 mg de cada um dos dois sólidos em éter de petróleo.

Utilizar éter de petróleo como fase móvel e 12 g de alumina neutra, já molhada com a fase móvel, para fase estacionária.

A coluna será construída utilizando um tubo de vidro de aproximadamente 1 cm de diâmetro interno, com uma torneira na saída, ou uma bureta de 50 mL.

3.1.2. Preparação da coluna

Com a torneira da coluna fechada, colocar cerca de 10 mL da fase móvel no tubo e depois um pequeno chumaço de lã de vidro, previamente embebido no mesmo solvente. Empurrar o chumaço com um bastão de vidro até a conexão do corpo do tubo com a torneira; ele servirá para impedir a saída das partículas. O chumaço não deve ser muito comprimido para não reduzir a vazão e para permitir a expulsão do ar, contido nele, pelo líquido. Além disso, não deve ser muito grande para não se tornar uma câmara de mistura pós-coluna. A parte superior deste tampão deve ser a mais plana possível. Com o tubo contendo cerca de 1/3 de seu volume de fase móvel, adicionar uma suspensão da fase estacionária na fase móvel. Abrir a torneira para deixar o líquido escoar e ao mesmo tempo formar a coluna da fase estacionária.

Após toda fase estacionária se encontrar dentro da coluna, passar 2 ou 3 volumes da fase móvel para acertar o enchimento, deixando sair a fase móvel, até que seu nível atinja o topo da fase estacionária.

3.1.3. Procedimento

Colocar no topo da coluna a solução dos dois sólidos a serem separados e abrir a torneira até que a solução atinja o topo da fase estacionária. Adicionar, cuidadosamente, alguns mL da fase móvel e deixe-a escoar; repetir o procedimento até ter uma coluna líquida incolor acima do topo do recheio. Colocar uma camada de areia (ou da mesma fase estacionária) no topo, para manter a superfície uniforme. Adicionar mais fase móvel e iniciar a eluição, recolhendo frações de 25 ml cada.

Quando a cor amarela atingir a torneira da coluna, começar a coleta. Reunir as frações amareladas e evaporar o solvente. O sólido amarelo restante é a fluorenona.

Evaporar o solvente das frações seguintes (incolores), resultando um sólido branco no fundo dos frascos (fluoreno). Quando não houver mais este resíduo branco, interromper a eluição. Reunir os resíduos dos frascos correspondentes ao fluoreno.

Verificar as massas dos dois sólidos recuperados, para determinar o rendimento da separação. Os pontos de fusão poderão ser utilizados para dar uma idéia da pureza dos compostos eluídos (fluoreno, p.f. 114°C (metanol):fluorenona, p.f. 82-83°C (éter de petróleo, 66-75°C)).

3.2. Separação de extrato de espinafre

3.2.1. Materiais

Preparar a amostra, fervendo 50 g de folhas de espinafre, das quais foram removidas as nervuras centrais, em 100 mL de água destilada, por 1-2 minutos. Resfriar rapidamente e decantar o líquido. Secar as folhas com papel absorvente e colocá-las em um almofariz com uma mistura de éter de petróleo (30-60°C) e acetona (80:20), triturando para obter uma solução verde que é decantada em um tubo de ensaio.

Utilizar éter de petróleo (30-60°C) e acetona como fases móveis, alumina (malha de 200-400) como fase estacionária e uma coluna de vidro, de aproximadamente 0,5 x 15 cm, provida de torneira.

3.2.2. Preparação da coluna

Seguir as indicações gerais da seção 3.1.2, usando éter de petróleo para preparar a suspensão de 2 g de alumina. A coluna deverá ter uma altura de aproximadamente 6 cm.

3.2.3. Procedimento

Utilizar um conta-gotas para transferir uma porção da amostra para o topo da coluna e abrir a torneira até a solução atingir o nível do recheio. Iniciar a eluição com éter de petróleo. Coletar a banda amarela quando esta começar a sair da coluna. Mudar a fase móvel para acetona e coletar a banda verde.

Obter os espetros de absorção no visível (380-700 nm) das duas soluções para identificá-las. A solução amarelada contém uma mistura de carotenos, enquanto que a solução de coloração verde contém uma mistura de clorofilas. As soluções assim separadas podem servir para outras análises, como cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência.

3.3. Separação de dicromato e permanganato

3.3.1. Materiais

Preparar uma solução contendo $K_2Cr_2O_7$ 0,2M e $KMnO_4$ 0,2M em H_2SO_4 0,05M.

Preparar as fases móveis: HNO_3 0,5M e H_2SO_4 1M.

Utilizar alumina como fase estacionária e um tubo de 0,8 cm de diâmetro interno, provido de torneira, ou uma bureta de 25 mL.

3.3.2. Preparação da coluna

Seguir as indicações da seção 3.1.2, utilizando HNO_3 0,5M para preparar a suspensão da fase estacionária. A coluna deverá apresentar uma altura de 12 cm.

3.3.3. Procedimento

Com uma pipeta, colocar 10 mL da solução de amostra no topo da coluna e abrir a torneira até que a solução atinja o topo do recheio. Adicionar, cuidadosamente, uma porção de HNO_3 0,5M e iniciar a eluição, em uma vazão de 2 mL/min, recolhendo frações de 2 mL cada. Quando toda a primeira banda colorida sair da coluna, trocar a fase móvel para H_2SO_4 1M e recolher frações de 3 mL até que a segunda banda colorida saia.

Ler as absorbâncias, contra água, das frações mais concentradas em 446 nm (dicromato) e 520 nm (permanganato), fazendo quaisquer diluições necessárias para obter uma leitura dentro da escala do colorímetro ou espectrofotômetro. Anotar as diluições feitas e diluir as outras frações de maneira similar. Ler as absorbâncias de todas as frações diluídas e traçar um gráfico relacionando as absorbâncias obtidas versus o número da fração, obtendo assim, o cromatograma correspondente à separação da mistura.

4. CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

4.1. Separação de cátions em resina de troca catiônica

4.1.1. Materiais

Preparar três soluções tampões de citrato 0,2M a pH 3,0, a pH 5,5 e a pH 3,0 contendo também NaCl 0,3M. Estas soluções serão preparadas a partir da quantidade necessária de ácido cítrico. Dissolvê-lo em um volume de 80% do volume final. Titular com NaOH concentrado até o pH desejado (monitorizar a operação com um pHmetro). A seguir, transferir quantitativamente o líquido para um balão volumétrico e completar para o volume pré-estabelecido (por ex., 1 L). No caso do tampão contendo NaCl, dissolver o sal com o ácido cítrico, ajustar o pH e completar o volume.

Preparar a amostra: solução contendo quantidades equimolares (0,5 a 0,8 M) de $CuSO_4 . 4H_2O$ e $CoCl_2 . 6H_2O$, dissolvidos no tampão citrato 0,2M a pH 3,0. Acrescentar glicerol para uma concentração final em torno de 15%. O glicerol tem a finalidade de evitar a difusão da amostra ao aplicá-la na coluna.

Usar como coluna, um tubo de dimensões reduzidas, por ex., 12 x 0,4 cm, com torneira na saída.

Utilizar uma resina trocadora de cátions com matriz de poliestireno-divinilbenzeno e grupo troccador $-SO_3^- H^+$

4.1.2. Preparação da resina

Pesar a quantidade necessária de resina para uma coluna (5 g para a coluna de 12 x 0,4 cm) e colocar em um béquer com cinco volumes de água destilada. Agitar vigorosamente. Deixar em repouso até que a massa de resina assente e, a seguir, retirar do sobrenadante os materiais finamente divididos. Esta operação é repetida cinco vezes. Transferir a resina para um funil de placa de vidro porosa, lavar sucessivamente com 100 mL de água destilada, 100 mL de ácido clorídrico 1,5M, 200 mL de água destilada, 100 mL de NaOH 1,5M, 200 mL de água destilada e, finalmente, com 50 mL do tampão citrato 0,2M a pH 3,0. A seguir, transferir a resina para um frasco contendo o mesmo tampão até a ocasião de uso.

4.1.3. Preparação da coluna

Colocar um chumaço de lã de vidro no fundo do tubo (acima da torneira) e encher com tampão citrato 0,2M a pH 3,0. Transferir a resina ativada para o tubo, mantendo uma vazão de 1 mL/min até que a resina atinja a altura desejada (por ex., 10 cm), ficando um espaço acima do recheio suficiente para aplicar a amostra e a fase móvel. Deixar eluir a coluna com um volume do tampão de pelo menos 5 vezes o volume ocupado pela resina.

4.1.4. Procedimento

Utilizar um volume de amostra contendo aproximadamente 0,3 nM dos cátions para cada um dos estudos a serem efetuados, iniciando a eluição tão logo a solução contendo a amostra atinja o topo da coluna. Recolher frações de 1 mL com a vazão da fase móvel, de preferência, 1,0 mL/min, à temperatura de cerca de 25°C.

No primeiro estudo, utilizar como fase móvel somente o tampão citrato 0,2M a pH 3,0. Recolher 45 frações.

Para o segundo estudo, após nova aplicação da amostra, eluir 12 frações com o tampão citrato 0,2M a pH 3,0 e, a seguir, trocar para o tampão citrato 0,2M a pH 5,5, recolhendo mais 10 frações.

No terceiro estudo, após aplicação de uma nova amostra, fazer a eluição usando somente o tampão citrato 0,2M a pH 5,5. Recolher 10 frações.

Antes de iniciar o quarto experimento, trocar a fase móvel dentro da coluna, passando 5 volumes do tampão citrato 0,2M a pH 3, contendo NaCl 0,3M. Aplicar a amostra e eluir 12 frações com esta mesma fase móvel. A seguir, trocar para o tampão citrato 0,2M a pH 5,5 e recolher mais 10 frações.

Ler as absorbâncias de todas as frações recolhidas, contra água, a 510 e 680 nm. Traçar gráficos para as duas leituras versus o número das frações. A absorção em 510 nm é devido ao íon Co^{2+} e a absorção em 680 nm é devido ao íon Cu^{2+}. Na análise dos resultados, lembrar que o ânion citrato tem a capacidade de complexar vários íons metálicos.

4.2. Separação de cátions com resina de troca aniônica

4.2.1. Materiais

Preparar uma amostra constituída por sais de ferro (1% - p/v), de cobalto (3% - p/v) e de níquel (2% - p/v), dissolvidos em HCl 12M.

Preparar 100 mL de HCl 9M. Preparar 45 mL de HCl 1M diluindo 5mL de HCl 9M em 40 mL de água destilada. Preparar 45 ml de HCl 2M diluindo 10 mL de HCl 9M com 35 mL de água. Preparar 30 mL de HCl 5M misturando 15 mL de HCl 9M e 15 mL de HCl 1M. Guarde estas soluções em frascos limpos e rotulados.

Utilizar como coluna um tubo de dimensões reduzidas, como por exemplo, 20 x 1 cm, com uma torneira em uma das extremidades.

Empregar uma resina de troca aniônica, com matriz de poliestireno-divinilbenzeno e grupo trocador $-N(CH_3)_3^+ Cl^-$.

Preparar 10 mL de cada uma das soluções necessárias para identificar os íons nas frações coletadas: solução aquosa de KSCN 0,1M, solução etanólica de dimetilglioxima 1% (p/v) e NH_4SCN 10% (p/v) em acetona.

4.2.2. Preparação da coluna

Colocar um chumaço de lã de vidro no fundo do tubo e encher com HCl 2M. Suspender 11 g da resina neste solvente e introduzi-la, aos poucos, para dentro da coluna, deixando escoar o líquido, até obter a altura desejada. A coluna deve conter a solução de HCl 2M até o momento de adicionar as outras soluções. Não deixar a coluna ficar seca, pois senão o escoamento será irregular; o líquido escoará pelas falhas da coluna e a separação será ineficiente. Adicionar a solução, ou fechar a torneira inferior, toda vez que o nível do líquido descer à altura da camada de resina.

4.2.3. Procedimento

Antes de iniciar a separação, trocar a fase móvel para HCl 9M, passando cerca de 15 mL desta pela coluna em uma vazão de 2,5 mL/min. Abaixar o nível da fase móvel até o topo da coluna e fechar a torneira. Colocar 2 mL da amostra e abrir a torneira para obter a mesma vazão anterior. Quando o nível cair novamente até o topo da coluna, juntar 5 mL de HCl 9M e recolher uma fração de 5 mL. Adicionar outra porção de 5mL de HCl 9M e recolher 5 mL do eluído em outro tubo. Repetir com mais 5 mL de HCl 9M. Marcar cada um dos tubos.

Continuar a eluição, usando 4 porções de 5 mL de HCl 5M; recolher 4 frações do eluído, em tubos separados e marcados.

Completar a eluição usando 5 porções de HCl 1 M; recolher os eluídos em frações de 5 mL em 5 tubos marcados.

Anotar as cores dos eluídos de cada uma das frações coletadas.

Quando a última porção de HCl 1M atingir o topo da coluna, lave-a com 10 mL de água e com o restante da solução de HCl 2M, para deixá-la pronta para uma nova análise. Fechar a torneira quando o nível de ácido estiver cerca de 2 cm acima do topo da coluna.

Identificar as várias soluções coloridas comparando-as a soluções de cloreto de ferro, de cobalto e de níquel em ácido clorídrico.

Para determinar a eficiência da separação, fazer cada um dos testes de identificação com uma gota de cada uma das frações coletadas, separadamente, em uma placa de toque.

Para verificar a presença de Fe^{3+}, juntar à gota a ser pesquisada, uma gota da solução de KSCN 0,1M. O aparecimento de uma mancha vermelho sanguíneo indica a formação do íon $Fe(SCN)^{2+}$

Colocar novas gotas das frações na placa de toque. Alcalinizar com algumas gotas de amônia 15M. Juntar uma gota de dimetilglioxima 1% (p/v) em etanol. Um precipitado vermelho brilhante indica a presença de níquel.

Para verificar a presença de cobalto nas frações eluídas, juntar às gotas de cada uma das frações uma gota da solução de NH_4SCN 10% (p/v) em acetona. O surgimento de uma coloração azul é devido a formação de íons $Co(SCN)^{2-}_4$.

5. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

5.1. Separação de albumina e azul de bromofenol

5.1.1. Materiais

Usar Sephadex G-25, previamente inchado seguindo as instruções do fabricante. Preparar as fases móveis: solução salina fisiológica (NaCl, 0,9% p/v) e tampão fosfato de sódio, 0,02M a pH 7,0. Adicionar a estas soluções um agente bacteriostático, como por exemplo, azida de sódio, NaN_3 , 0,02% (p/v).

Preparar uma mistura de calibração: Blue Dextran 9 mg/mL, sulfato de vanadil 90 mg/mL e dinitrofenol 5 mg/mL.

Preparar a amostra misturando 1 mL de soro humano e 1 mL de uma solução saturada de azul de bromofenol em salina fisiológica.

Utilizar, como coluna, um tubo de vidro de 60 cm x 1 cm, fechado com uma torneira, ou uma bureta de 50 mL.

5.1.2. Preparação da coluna

Segundo a metodologia descrita na seção 3.1.2, deste capítulo, rechear o tubo até uma altura de 30 cm com a fase estacionária, usando o tampão fosfato de sódio 0,02M. No final do enchimento a estrutura não deve ter rachaduras ou secções descontínuas. Uma certa quantidade de líquido deve permanecer na parte superior da coluna que é protegida por um disco de papel de filtro empurrado cuidadosamente até atingir a superfície superior do gel; este procedimento previne a agitação ao se adicionar a amostra ou eluente. A vazão não deve ser menor que 0,5 mL/min. Lavar a coluna com a mesma fase móvel, durante 30 minutos, mantendo uma pressão líquida equivalente a 20 mL de água acima da coluna.

5.1.3. Calibração da coluna

Retirar ou deixar eluir a maior parte do eluente acima do topo da coluna e introduzir cuidadosamente 1 mL da mistura de calibração. Após penetração no gel, adicionar 1 mL de eluente para levar o resto do soluto. A seguir adicionar 20 mL de eluente e começar a coleta de frações de 1 mL, que poderá ser feita a partir do momento em que a mistura de calibração for introduzida. A determinação da concentração do

soluto nas frações será feita espectrofotometricamente nos comprimentos de onda respectivos: Blue Dextran, 630 nm; sulfato de vanadil, 630 nm e dinitrofenol, 400 nm. E' possível que mais de um pico amarelo se forme devido a dissociação do dinitrofenol; considerar como sendo o dinitrofenol, o pico de maior absorção.

O Blue Dextran é um soluto de alta massa molecular (2×10^6) que tem um valor de $K_o = 0$ em Sephadex G-25. Portanto, seu volume de eluição é o volume intersticial da coluna, V_o.

Calcular, a partir das dimensões da coluna (diâmetro interno e altura da fase estacionária), o volume total da coluna, V_c. O volume intrasticial, V_i, do gel é:

$$V_i = V_t - V_o = \frac{W_r \times d}{W_r + (d + 1)}$$

onde, para o Sephadex G-25, o W_r, ganho em água do gel seco, é 2,5 mL/g e o d, densidade do gel inchado, é 1,13 g/mL.

Repetir a mesma calibração usando salina fisiológica como fase móvel. Calcular V_i para as duas condições e comparar seus valores.

Os outros dois solutos, sulfato de vanadil e dinitrofenol, têm pequenas massas moleculares, respectivamente 163 e 180. Calcular os valores de K_o para sulfato de vanadil e dinitrofenol, a partir da relação:

$$K_o = \frac{V_R - V_o}{V_i}$$

Quais conclusões podem ser obtidas a partir deste valores? Calcular a mobilidade relativa, R, onde $R = V_o / V_R$.

Após lavar a coluna com a solução salina por pelo menos 30 minutos, repetir a experiência usando esta fase móvel. Comparar os valores de V_o, R e K_o obtidos usando os dois eluentes.

5.1.4. Procedimento

Aplicar 0,4 mL da amostra na coluna, seguindo a metodologia de aplicação descrita em 5.1.3., usando a solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) como fase móvel. Coletar frações de 1 mL e, no final de 5 mL, determinar as concentrações dos eluatos azuis a 605 nm. Os eluatos contendo proteína poderão ser determinados por leitura em 280 nm ou por dosagem por um dos vários métodos disponíveis para proteínas. Determinar os valores de V_R e K_o para as duas substâncias.

5.2. Verificação da redução de metahemoglobinas usando cromatografia por exclusão

5.2.1. Materiais

Preparar uma solução tampão fosfato de sódio, 0,02M a pH 7,0.

Preparar uma solução de metahemoglobina, diluindo 0,1 mL de sangue total tratado com 1 mL de tampão fosfato 0,02M a pH 7 e juntando 5 mg (excesso) de ferricianeto de potássio.

Preparar uma solução de ditionato de sódio, 10 mg/mL.

Utilizar como fase estacionária, o Sephadex G-25, previamente inchado. Preparar a coluna segundo o procedimento da seção 5.1.2. e calibrá-la de acordo com a seção 5.1.3.

5.2.2. Procedimento

Aplicar 0,2 mL da solução de ditionato de sódio à coluna e a seguir, 3 mL de tampão. Após cada adição esperar o líquido penetrar na coluna. Aplicar 0,5 mL da solução de metahemoglobina. Lavar o topo da coluna com 0,5 mL de tampão e iniciar a eluição, recolhendo frações de 1 mL. Observar a mudança de coloração e explicar.

6. CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

6.1. Separação de hemoglobinas glicosiladas

6.1.1. Materiais

Preparar as solucões tampão: (1) acetato de amônio 0,25 M a pH 8,5 sendo 0,05M em $MgCl_2$ e (2) borato de sódio 0,1M, pH 6,5, sendo 1mM em $MnCl_2$.

6.1.2. Preparação da coluna

Preparar um tubo cromatográfico (9,0 x 0,4 cm) de modo semelhante à descrição apresentada no item 3.1.2. Transferir para um funil de placa porosa aproximadamente 1,5 ml do gel (Con A-Sepharose da Pharmacia) e lavar exaustivamente com água (500 ml), sob pressão reduzida, cuidando para que o gel nunca fique totalmente seco. Após completar a lavagem, transferir a suspensão do gel para o tubo cromatográfico até uma altura de 8,0 cm (1,0 ml). Lavar com água e normalizar a vazão para aproximadamente 0,5 ml/min. Lavar a coluna com o tampão (1), utilizando um volume correspondente a 8 - 10 vezes ao do gel. Interromper a vazão, tomando o cuidado de não deixar secar o gel.

Obs.: Caso houver dificuldade para preparar o tubo cromatográfico indicado,utilize uma pipeta com dimensões aproximadas adaptando na saída um tubo plástico flexível, controlando a vazão por um torniquete.

6.1.3. Preparação da amostra

Preparar a amostra, centrifugando a 4000 g por 10 min, 20 ml de sangue total colhido na presenca de anticoagulante (EDTA ou heparina). Desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado que contém os eritrócitos com 4,0 ml de cloreto de sódio a 1%. Centrifugar na mesma condição anterior e desprezar o sobrenadante. Repetir a última operação mais uma vez. Adicionar ao precipitado 6,0 ml de água destilada para romper a membrana dos eritrócitos (presso osmótica). Agitar por 1 min, de preferência em agitador tipoVortex, e deixar repousar 15 minutos. Centrifugar na mesma rotação anterior por 15 minutos. O sobrenadante contém a hemoglobina e outros componentes dos eritrócitos.

6.1.4. Procedimento

Colocar cuidadosamente 0,1 ml do hemolisado no topo da coluna, lavando as paredes do tubo cromatográfico com 0,5 ml do tampão (1). Usar o mesmo tampo para eluição de hemoglobina não glicosilada e recolher fracões de 2,0 ml. Determinar as absorvâncias das frações recolhidas em 415 nm. Proceder a

eluição da coluna com o tampão (1) até que o valor da absorvância, no comprimento de onda indicado, seja o valor do branco. A seguir, iniciar a eluição fase estacionária com o tampão (2) para as glicoproteínas serem eluídas. Recolher frações de 2,0 ml e determinar suas absorvâncias em 415 nm. Toda a operação pode ser realizada à temperatura ambiente. Para calcular a porcentagem de hemoglobina glicolisada eluída, utilize a fórmula:

$$\% \text{ Hb glicolisada} = \frac{x}{x + 5y} \times 100$$

onde x = absorvância em 415 nm das frações eluídas com tampão (2)

y = absorvância em 415 nm das frações eluídas com o tampão (1).

6.1.5. Comentários

Uma glicoproteína pode conter uma ou diversas unidades de carboidratos.Os principais pontos de ligação do açúcar na molécula protéica são cadeias laterais de serina, trionina, aspargina, hidroxiprolina, lisina e aminoácido N-terminal. Nos eritrocitos de adultos normais são encontrados vários tipos de hemoglobinas sendo a mais abundante (90 a 95%) a do tipo A (HbA, 2 subunidades A e duas subunidades B). A parte restante (5 a 10%) são hemoglobinas HbA_2 (25%), HbF (0,5%), HbA_{1a} (0,2%), HbA_{1b} (0,4%) e HbA_{1c} (3-5%). A possibilidade de formação de hemoglobinas glicosiladas nas condições fisiológicas surge da reação não catalisada da valina N-terminal das subunidades B da cadeia da hemoglobina com a glicose-6-fosfato. Na hemoglobina HbA_{1c} este é o principal sítio de glicosilaco, embora a literatura cite que ocorram sítios secundários na porção N-terminal da cadeia α e nos E-amino grupos das cadeias laterais de lisina. Nos indivíduos com diabetes a porcentagem de HbA_{1c} pode ser o dobro da encontrada nos indivíduos normais.

O grupo protéico heme é o responsável pela absorção da hemoglobina em 415 nM.

Concanavalina A-Sepharose é uma fase estacionária seletiva para glicoproteínas e polissacarídeos, obtida por ligação covalente da metaloproteína de planta (Concanavalina A) a Sepharose 4B. Os sítios de ligações da Concanavalina A são específicos para os resíduos α-D-manosil e α-D- glucosil. A formação destes sítios de ligação na molécula de Concanavalina A requer a presença de íons Mn^{2+} e Ca^{2+} . Qualquer glicoproteína que possue em seu final o grupo α-D- monopiranosil ou α -D-glicopiranosil ligará a Con A-Sepharose.

Esta resina é armazenada em refrigerador a 3-8°C nas condições específicas do fabricante.

7. CROMATOGRAFIA GASOSA

7.1. Otimização da análise e quantificação de uma mistura de hidrocarbonetos

7.1.1. Materiais e equipamentos

Preparar uma solução padrão de três (ou mais) compostos alifáticos ou aromáticos (por ex., ciclohexano, benzeno e tolueno) na razão de 1:1:1. Fornecer ao aluno uma amostra contendo os mesmos compostos em concentrações desconhecidas.

Utilizar uma coluna de aço inox (0,4 x 200 cm) recheada com fase estacionária de óleo de silicone (SE-30 ou similar), 15% sobre Chromosorb W (malha de 80-120).

Utilizar uma fase móvel consistente com o detector a ser empregado, isto é, nitrogênio para o detector por ionização em chama e hidrogênio ou hélio para o detector por condutividade térmica.

Empregar um cromatógrafo a gás apropriado e seguir cuidadosamente as instruções do fabricante quanto ao aquecimento do aparelho, acerto da(s) vazão(ões) do(s) gás(es) e acerto do registrador.

As condições iniciais de operação do cromatógrafo a gás são:

Temperatura da coluna	= 60°C
Temperatura do injetor	= 130°C
Temperatura do detector	= 150°C
Vazão do gás de arraste	= 40 mL/min

7.1.2. Procedimento

Após atingidas as condições de operação do cromatógrafo, injetar 2 μL de cada um dos componentes separadamente e, a seguir, a mistura 1:1:1. Escolher uma atenuação que permita ter todos os picos dentro da escala do papel do registrador. Procurar ter os maiores picos possíveis, sem que sejam necessárias mudanças da atenuação durante a corrida cromatográfica.

Medir ou calcular, a partir dos cromatogramas obtidos, t_R , R_s (resolução entre os picos adjacentes) e n (número de pratos teóricos).

Repetir o teste, mudando a temperatura da coluna de 15 em 15°C (até 120°C), mantendo a vazão do gás de arraste em 40 mL/min. O tempo necessário de condicionamento da coluna é de cerca de 20 minutos. A partir destas observações, determinar qual é a temperatura ótima, para se obter uma resolução igual ou maior a um para todos os componentes da amostra, com o mesmo número de pratos teóricos.

Ajustar a temperatura da coluna no valor ótimo e, usando apenas a mistura 1:1:1, fazer outros cromatogramas, variando a vazão do gás de arraste (maior e menor que 40 mL/min.), estabelecendo a vazão ótima para esta temperatura.

Com os parâmetros otimizados, injetar 2 μL da amostra desconhecida e determinar o seu conteúdo.

Injetar a mistura 1:1:1 e a amostra várias vezes e determinar as áreas dos picos; determinar as médias das áreas dos picos correspondentes. A partir das médias das áreas dos picos presentes na amostra, calcular a percentagem de cada composto pelo método da normalização:

% do componente 1 = (área 1 / somatória das áreas) x 100.

Utilizando a mistura 1:1:1 determinar o fator de resposta de cada componente, dividindo a percentagem real pela observada. Aplicar este fator de resposta nas médias das áreas dos picos da amostra desconhecida para corrigir as suas áreas e, calcular novamente o conteúdo percentual da amostra.

7.2. Identificação e quantificação de álcoois superiores em aguardente de cana

7.2.1. Materiais e equipamentos

Preparar 10 mL de uma solução padrão contendo 2,6 mg de n-propanol, isobutanol e 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e 2,0 mg de 2-pentanol (padrão interno) em etanol 43% (v/v). Optou-se pela utilização de etanol 43% (v/v), por ser este o teor alcoólico mais comumente encontrado em aguardentes. A massa de 2,6 mg de cada álcool corresponde a 180 mg/100 mL de álcool 100% (expresso em álcool isoamílico), a concentração máxima recomendada pela legislação do estado de São Paulo, em bebidas destiladas.

Usar uma aguardente de cana, preferencialmente de fabricação caseira. Preparar a amostra adicionando 1 mL de uma solução 0,2% (p/v) de 2-pentanol em etanol 43% (v/v) a 9 mL da aguardente. Dessa maneira tem-se a mesma concentração do padrão interno na amostra e no padrão, ou seja, 0,2 mg/mL.

Utilizar uma coluna de aço inox (0,47 x 300 cm) recheada com Hallcomide M 18 OL 15% em Chromosorb W, ou outra fase estacionária de características de polaridade similares.

Utilizar nitrogênio como fase móvel.

Empregar um cromatógrafo a gás equipado com um detector por ionização em chama. Seguir cuidadosamente as instruções do fabricante quanto ao aquecimento do aparelho, ao acerto da vazão do gás de arraste, a ignição e alimentação da chama, e ao acerto do registrador.

As condições de operação do cromatógrafo a gás sugeridas para este experimento são:

Temperatura da coluna = 100°C

Temperatura do injetor = 130°C

Temperatura do detector = 150°C

Vazão do gás de arraste = 50 mL/min

7.2.2. Procedimento

Uma vez atingidas as condições de operação do cromatógrafo, injetar 5μL da solução padrão, obtendo-se um cromatograma similar ao da *Figura X-2*. Repetir as injeções, até obter 3 cromatogramas similares.

A seguir, injetar 5 μ L da amostra de aguardente contendo o padrão interno. Repetir as injeções até obter 3 cromatogramas similares.

RESPOSTA DO DETECTOR

1

2

3

4

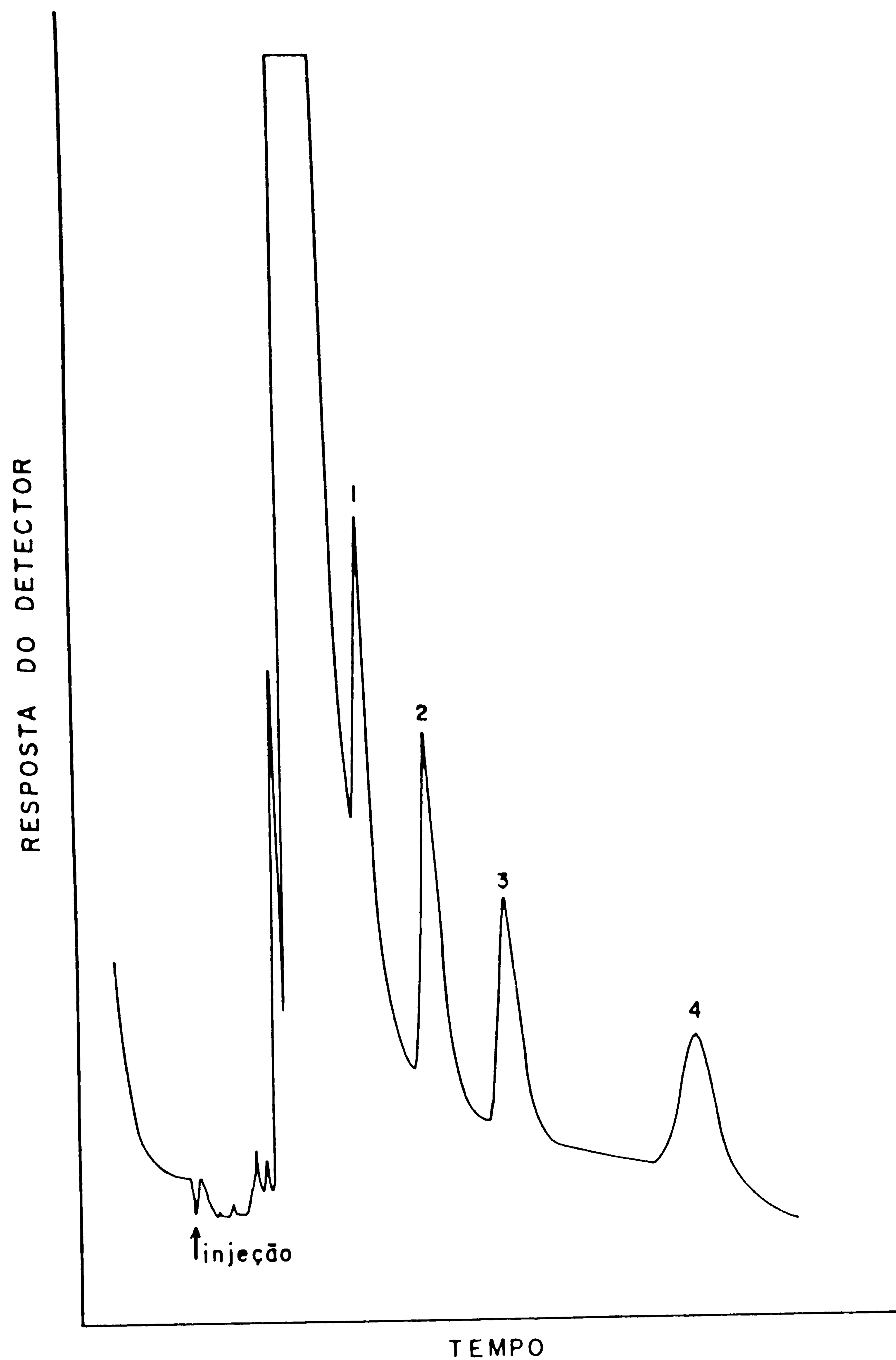
injeção

TEMPO

FIGURA X-2 Cromatograma de uma amostra padrão de álcoois superiores. 1: n-propanol; 2: isobutanol; 3: padrão interno, 4: 3-metil-1-butanol.

Comparar os tempos de retenção observados nos cromatogramas da solução padrão e da amostra, e identificar os álcoois superiores presentes na amostra.

Calcular as áreas dos picos correspondentes aos álcoois e padrão interno e fazer a média das áreas de cada composto. Utilizando a média das áreas de um dos picos do cromatograma da solução padrão e a área do padrão interno, determinar a constante K:

$$A_i / A_p = K C$$

onde, A_i é a área do composto que se deseja determinar a concentração na amostra, A_p é a área do padrão interno e C é a concentração do composto de interesse na solução padrão (mg/mL).

Utilizar o cromatograma obtido na injeção da amostra para o cálculo de A_i e A_p. Utilizando esta fórmula e a constante K, já determinada a partir da solução padrão, calcular a concentração de cada um dos álcoois superiores na amostra analisada (mg/100 mL).

Comparar os resultados obtidos na experiência com os valores recomendados pela legislação.

7.3. Análise de fármacos em plasma

7.3.1. Materiais e equipamentos

Preparar 100 mL de uma solução que contenha 160, 120, 120, 120 e 240 mg de cafeína, oxazepam, lorazepam, diazepam e clordiazepóxido, respectivamente, em metanol. A partir desta solução preparar diluições em metanol: 1:2, 1:4 e 1:8, que serão as soluções de uso. Preparar uma solução de metaqualona, 1mg/ml, em metanol, que será usada como padrão interno.

Transferir 100 μL da primeira solução de uso (diluição 1:2), juntamente com 25 μL da solução do padrão interno, para um tubo de centrífuga com tampa esmerilhada. Repetir o procedimento com as outras duas soluções de uso. A cada um dos tubos adicionar 1 mL de plasma de referência (obtido de indivíduos não medicados nas últimas 72 horas), 1 mL de ácido sulfúrico 0,25M (ou quantidade suficiente para obter pH2) e 10 mL de 1-clorobutano destilado. Agitar a mistura em um "mixer" por 1 min e centrifugar a 3000 rpm, durante 4 min. Separar as fases orgânicas e reextrair as fases aquosas com 10 mL de clorofórmio. Reunir as fases orgânicas respectivas e evaporar os solventes orgânicos a 40°C sob o fluxo de ar.

Aos extratos secos adicionar 100 μ L de metanol, no momento da análise.

A 1 mL de plasma de um indivíduo que está sendo medicado com um dos fármacos relacionados anteriormente, adicionar 25 μL da solução do padrão interno, 100 μL de metanol, 1 mL de H_2SO_4 0,25M e 10 mL de 1- clorobutano destilado. Tratar esta mistura de maneira idêntica às soluções padrões, obtendo o extrato seco ao qual adiciona-se 100 μL de metanol, no momento da análise.

Utilizar nitrogênio como fase móvel e uma coluna (0,32 x 120 cm), recheada com fase estacionária OV-17, 3% em Chromosorb W-HP, ou outra coluna com características similares.

Empregar um cromatógrafo a gás equipado com um programador de temperatura e com um detector por ionização em chama. Seguir cuidadosamente as instruções do fabricante quanto ao acerto do equipamento nas seguintes condições:

Temperatura da coluna	- 200 a 262° C a 4°C/min
Temperatura do injetor	- 280°C
Temperatura do detector	- 280°C
Vazão do gás de arraste	- 40 mL/min

7.3.2. Procedimento

Injetar 2 μL de cada solução padrão, bem como do mesmo volume da amostra contendo somente o padrão interno.

O cromatograma da *Figura X-3* mostra a separação obtida para os fármacos citados. Os picos não identificados são devido a substâncias endógenas presentes no plasma.

Após obtenção dos cromatogramas relativos a cada diluição da solução padrão dos fármacos, construir um gráfico da razão da altura (ou área) do pico do fármaco e altura (ou área) do pico do padrão interno versus a concentração do fármaco. Utilizando este gráfico ou o cálculo citado na seção 7.2.2., determinar a concentração do fármaco na amostra.

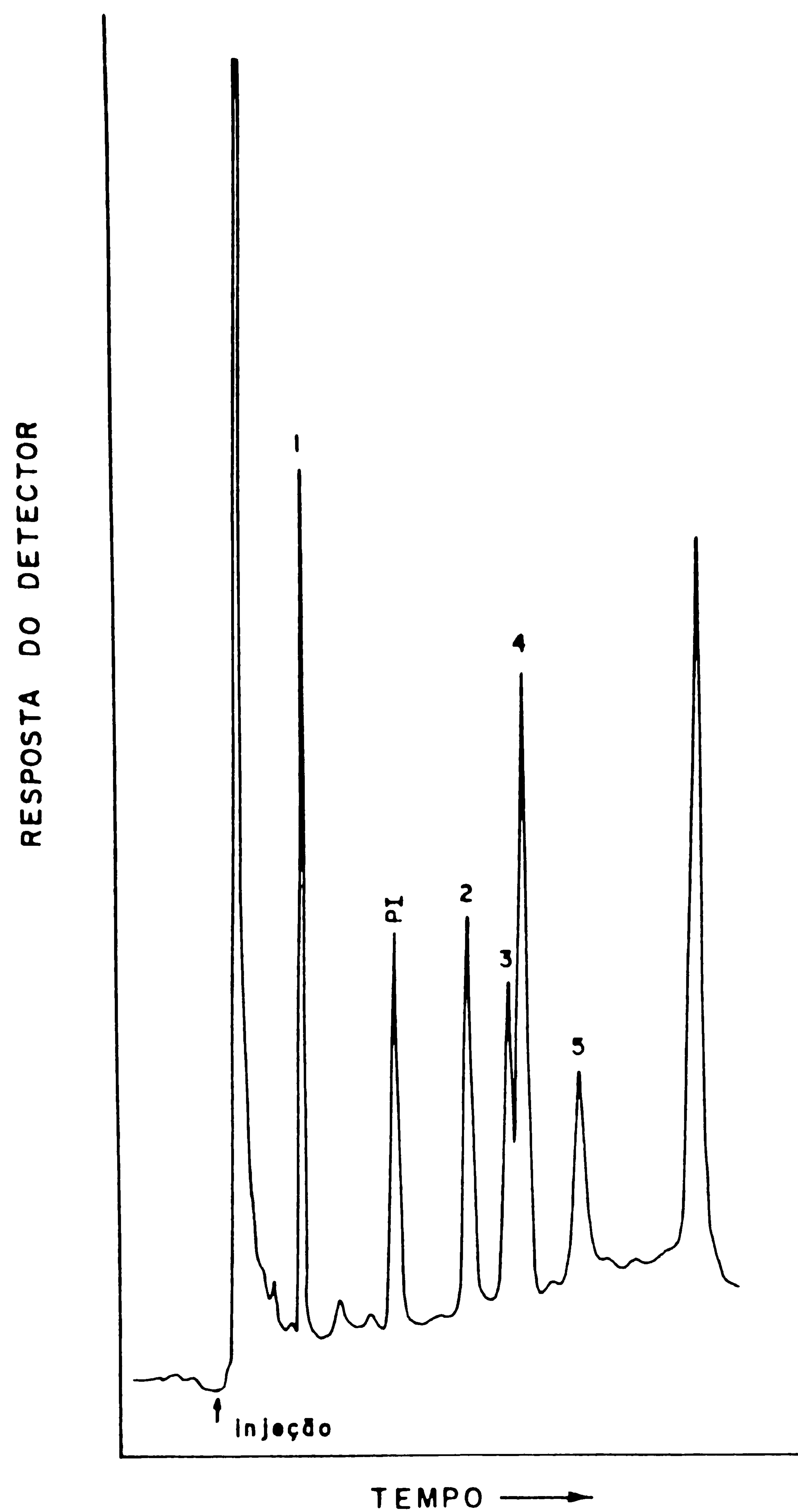



FIGURA X-3 Cromatograma de uma amostra de extrato de plasma adicionado de fármacos padrões. 1: cafeína; 2: oxazepam; 3: lorazepam; 4: diazepam; 5: clordiazepóxido.

8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

8.1. Análise de analgésicos

8.1.1. Materiais e equipamentos

Preparar 50 mL de uma solução padrão em metanol contendo ácido acetilsalicílico (86,0 mg), salicilamida (87,8 mg), cafeína (28,1 mg) e fenacetina (11,4 mg) (*Figura X-4*).

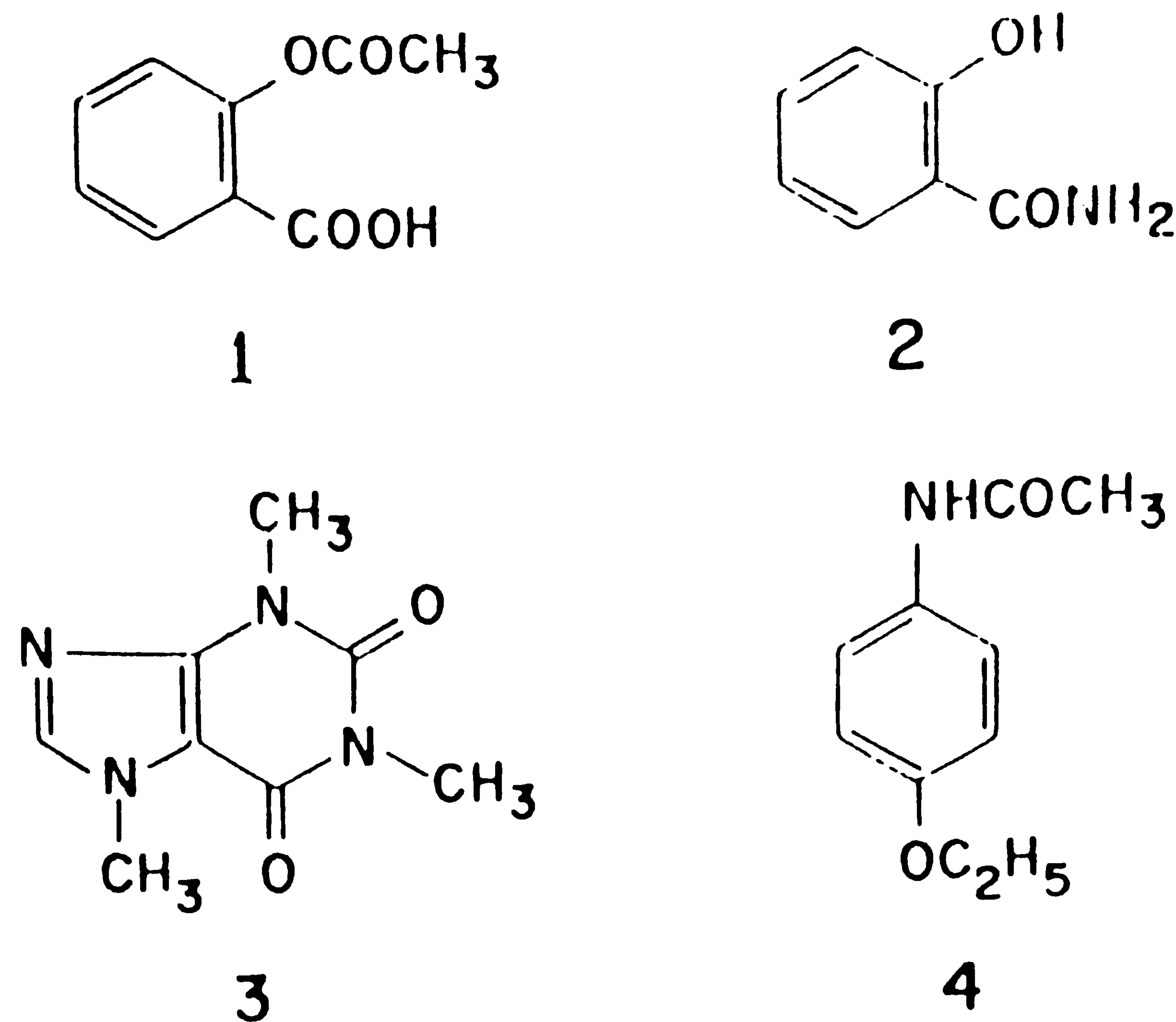



FIGURA X-4 Estruturas de alguns analgésicos. 1: ácido acetilsalicílico; 2: salicilamida; 3: cafeína; 4: fenacetina

Preparar a amostra triturando um comprimido que contenha um ou mais dos compostos acima e adicionando alguns mL de metanol. Filtrar a suspensão para um frasco volumétrico de 10 mL e completar o volume com metanol.

Preparar tampões fosfato 0,025M a pH 5, a pH 7 e a pH 9 dissolvendo quantidades apropriadas de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 em água destilada e ajustar o pH com NaOH ou H_3PO_4, através de um pHmetro.

A partir do tampão a pH 7, preparar fases móveis contendo 30, 40, 50 e 60% (v/v) de metanol. Com os tampões a pH 5 e pH 9 preparar fases móveis com 40 e 50% (v/v) de metanol. Todas as soluções devem ser filtradas antes do uso.

Utilizar uma coluna de 0,46 x 25 cm contendo um recheio tipo fase reversa (C-18 ou C-8), partículas de 10 μm, ou similar.

Empregar um cromatógrafo a líquido equipado com uma bomba, válvula rotatória para amostragem e detector por absorbância no ultravioleta.

As condições sugeridas para operação do cromatógrafo são:

Vazão da fase móvel	= 2 mL/min
Comprimento de onda do detector	= 254 nm
Volume do amostrador	= 10 μL

8.1.2. Procedimento

Condicionar a coluna com a fase móvel contendo 60% de metanol e 40% de tampão fosfato 0,025M a pH 7 (cerca de 15 minutos) e injetar 10 μL da solução padrão, obtendo-se um cromatograma.

Repetir este procedimento com as outras fases móveis preparadas, lembrando de condicionar a coluna por 15 minutos cada vez que a fase móvel é trocada (obtém-se o equilíbrio na coluna quando a linha de base gerada pelo detector torna-se constante).

As composições químicas diferentes dos compostos levam a interações diferentes com as fases móvel e estacionária, resultando em diferentes cromatogramas.

Selecionar a fase móvel que proporciona a melhor separação, como mostra a *Figura X-5*, e confirmar a identidade dos picos, injetando os solutos, em metanol, individualmente (não há necessidade de se ter soluções de concentração conhecida).

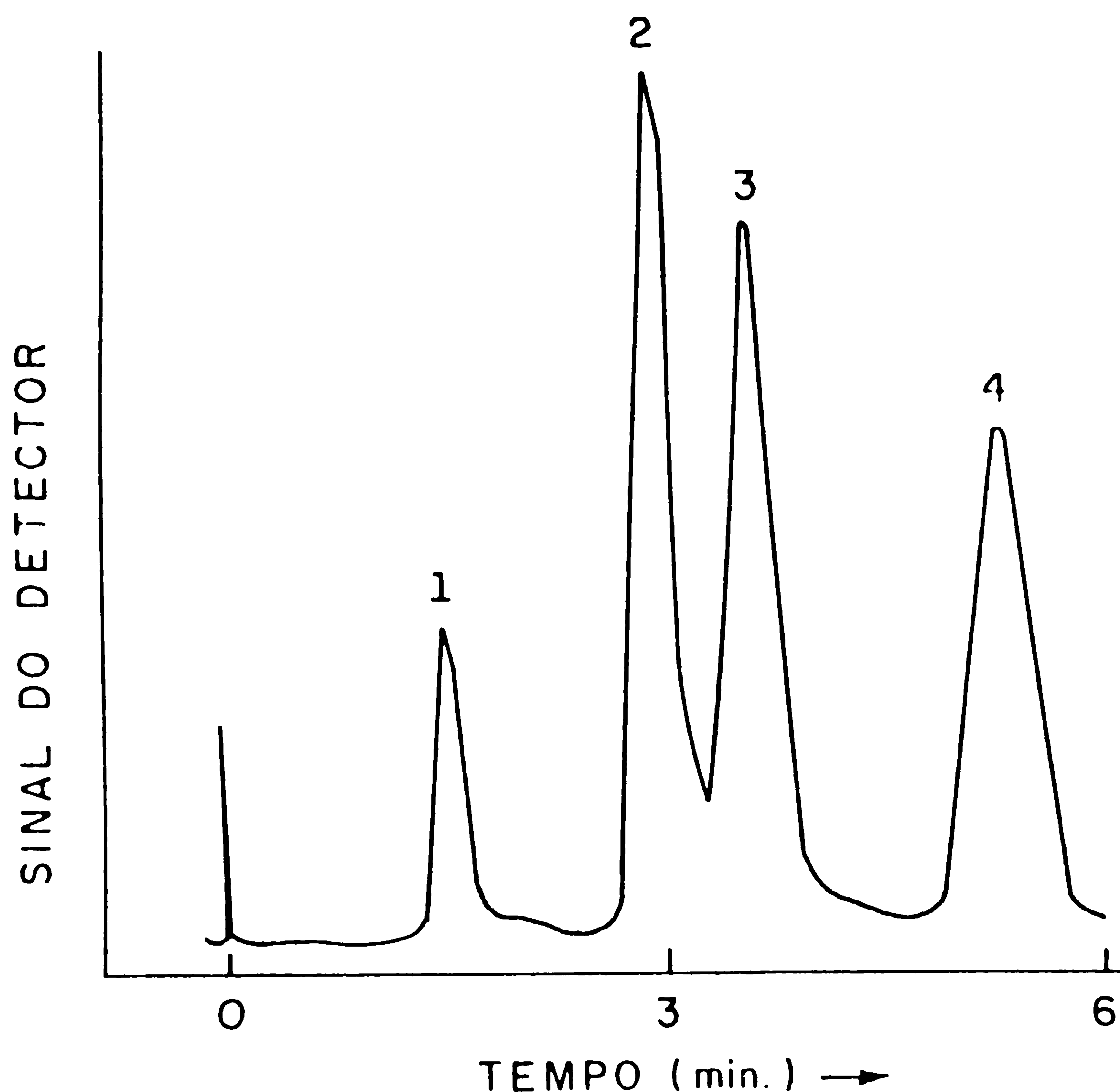



FIGURA X-5 Cromatograma de uma amostra padrão dos analgésicos. 1: ácido acetilsalicílico; 2: salicilamida; 3: cafeína; 4: fenacetina.

Usando a fase móvel que deu melhores resultados, injetar 10 μL da amostra do comprimido, identificando os analgésicos presentes. A quantificação pode ser feita comparando-se as áreas dos picos da amostra e da solução padrão, corrigindo os volumes usados.

8.2. Determinação de cafeína em várias bebidas

8.2.1. Materiais e equipamentos

Preparar uma solução estoque, em água destilada, contendo 1000 ppm de cafeína (previamente seca em estufa a 110°C durante uma hora) e, a partir desta, 4 ou 5 soluções aquosas padrões, contendo de 1 a 40 ppm de cafeína.

Preparar a amostra a partir de uma quantidade típica para consumo de uma bebida contend[illegible] [illegible]ína (café solúvel, chá, coca cola, etc.). Degaseificar as bebidas carbonatadas por agitação, vácuo ou ultra-som. Filtrar a quantidade selecionada de bebida e diluir com água. Sendo que a diluição dependerá da quantidade de cafeína na amostra, mais de uma diluição deve ser feita (por ex., 1:5, 1:10 e 1:20).

Utilizar uma mistura de metanol/água (30:70 v/v) como fase móvel e uma coluna de 0,46 x 25 cm contendo recheio do tipo fase reversa (C-18 ou C-8), partículas de 10 μm, ou similar.

Empregar um cromatógrafo a líquido equipado com uma bomba, válvula rotatória para amostragem e detector por absorbância no ultravioleta.

As condições sugeridas para operação do cromatógrafo são:

Vazão da fase móvel	= 2 mL/min
Comprimento de onda do detector	= 254 nm
Volume do amostrador	= 10 μL

8.2.2. Procedimento

Condicionar a coluna com a fase móvel (cerca de 15 minutos) e, a seguir, injetar 10 μL de cada solução padrão e amostra. A ordem de injeção é aleatória e as injeções devem ser repetidas até obter três cromatogramas similares de cada solução.

Calcular as áreas (ou medir as alturas) dos picos de cafeína e, a partir das médias, construir uma curva de calibração (método da padronização externa), que é usado para quantificar a amostra.

8.3. Análise de alguns barbitúricos

8.3.1. Materiais e equipamentos

Preparar uma solução de KH_2PO_4 2 x 10^{-3} M.

Preparar uma solução padrão dissolvendo 10 mg de barbital, butabarbital, fenobarbital, amobarbital e secobarbital em 20 mL de acetonitrila, completando o volume a 25 mL em um balão volumétrico com KH_2PO_4 2 x 10^{-3} M.

Preparar a solução da amostra adicionando 10 mg de barbital a 50 mg da amostra, dissolvendo a mistura em 20 mL de acetonitrila e completando o volume a 25 mL com KH_2PO_4 2 x 10^{-3} M.

Preparar fases móveis, misturando acetonitrila com a solução de KH_2PO_4 2 x 10^{-3} M, nas porcentagens (v/v) de 20, 30, 40, 50, 60 e 70% de acetonitrila.

Utilizar uma coluna de 0,46 x 25 cm contendo recheio do tipo fase reversa (C-18 ou C-8), partículas de 10 μm ou similar.

Empregar um cromatógrafo a líquido equipado com uma bomba, válvula rotatória de amostragem e detector por absorbância no ultravioleta com comprimento de onda variável.

As condições sugeridas para operação do cromatógrafo são:

Vazão da fase móvel	= 2 mL/min
Comprimento de onda do detector	= 225 nm
Volume do amostrador	= 20 μL

8.3.2.Procedimento

Condicionar a coluna com a fase móvel contendo 70% de acetonitrila (cerca de 15 minutos) e injetar 20 μL da solução padrão obtendo-se um cromatograma. Repetir este procedimento com as outras fases móveis preparadas, lembrando de equilibar a coluna por 15 minutos cada vez que a fase móvel é trocada.

Selecionar as condições que proporcionam a melhor separação, como mostra a *Figura X-6* e confirmar a identidade dos picos, injetando os solutos individualmente dissolvidos em acetonitrila/KH_2PO_4 (estas soluções não necessitam ter a concentração de barbital conhecida).

Usando as melhores condições, injetar 20 μL da amostra de concentração desconhecida.

Calcular as áreas do pico correspondente ao barbital e dos picos dos outros componentes da amostra e da solução padrão e, a partir destas, quantificar a amostra pelo método do padrão interno, usando as razões de área do padrão interno (barbital) e dos componentes.

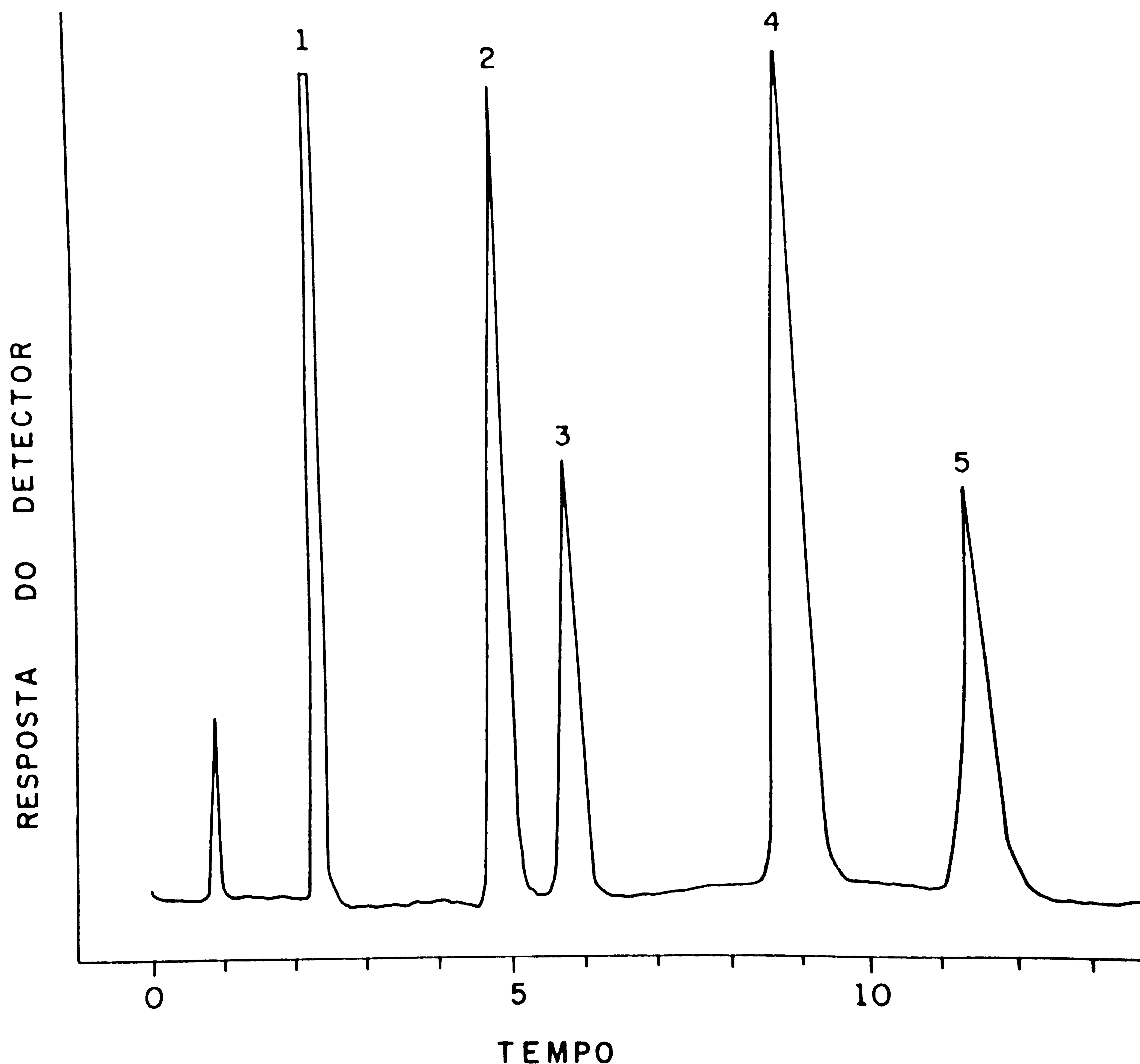



FIGURA X-6 Cromatograma de uma amostra padrão de alguns barbitúricos.
1: barbital; 2: butobarbital; 3: fenobarbital; 4: amobarbital; 5: secobarbital.

APÊNDICES

1.

SÍMBOLOS PARA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Símbolo	Definição
A	área
As_{10}	fator de assimetria do pico (em 10% da altura do pico)
A_s	área superficial específica
C_M	concentração do soluto na fase móvel
C_S	concentração do soluto na fase estacionária
d_c	diâmetro interno da coluna
d_f	espessura da fase estacionária líquida
d_M	distância de retenção da fase móvel; distância de retenção de um componente não retido
d_p	diâmetro da partícula (da fase estacionária sólida ou suporte sólido)
d_R	distância de retenção do soluto
D_m	razão de distribuição de massas $= n_s/n_M = (1-R)/R = t'_R/t_M$
D_M	coeficiente de difusão do soluto na fase móvel
D_S	coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária
E	eficiência $= t_R/w_b$
f	velocidade do papel registrador
F	vazão da fase móvel nas condições ambientes (unidades de volume por tempo)
F_c	vazão da fase móvel na temperatura da coluna (CG) $= F\,T_c/T_a$
h	altura equivalente a um prato teórico $= L/n$
h_r	altura reduzida equivalente a um prato teórico $= h/d_p$
H	altura equivalente a um prato efetivo $= L/N$
H_r	altura reduzida equivalente a um prato efetivo $= H/d_p$
I	índice de retenção (de Kovats)
j	fator de compressibilidade (correção de pressão em CG) $= 3.\{(P_i/P_o)^2-1\}/2\{(P_i/P_o)^3-1\}$
k,k'	fator de capacidade; grau de retenção $= n_S/n_M = t'_R/t_M$ (ver D_m)
K_D	coeficiente de distribuição, participação ou retenção $= C_S/C_M = D_m\beta$
K_R	coeficiente de retenção (ver K_D)
L	comprimento da coluna
n	número de pratos teóricos $= 16t_R^2/w_b^2 = 5{,}545t_R^2/w_h^2$
n_{req}	número de pratos teóricos requeridos: $16R_S^2\,[(\alpha/(\alpha-1))]^2[(D_{m2}-1)/D_{m2}]_2 = 16R_S^2\,[\alpha^*/(\alpha^*-1)]^2$
n_M	número de moléculas do soluto na fase móvel
n_S	número de moléculas do soluto na fase estacionária
N	número de pratos efetivos $= 16t'^2_R/w_b^2 = 5{,}545t'^2_R/w_h^2$
N_{req}	número de pratos efetivos requeridos $= 16R_S^2[\alpha/(\alpha-1)]^2$
P	Pressão
P_i	pressão na entrada da coluna
P_o	Pressão na saída da coluna

1.

SÍMBOLOS PARA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Símbolo	Definição
$r_{i,p}$	retenção relativa a um padrão = t_{R_i}/t_{R_p} (p = padrão)
R	fator de retenção = $n_M/(n_M + n_S) = t_M/t_R$
R_S	resolução = $2(t_{R2} - t_{R1})/(w_{b1} + w_{b2})$
t_M	tempo de retenção da fase móvel; tempo de retenção de um componente não retido pela fase estacionária = d_M/f
t_R	tempo de retenção do soluto = d_R/f
t'_R	tempo de retenção ajustado ($t'_R = t_R - t_M$)
T	temperatura (Kelvin)
T_a	temperatura ambiente
T_c	temperatura da coluna
TZ	número de separação (trennzahl) (CGAR) = $[(t_{R2}-t_{R1}/\emptyset)(w_{h2}+w_{h1})]^{-1}$
u	velocidade linear da fase móvel - L/t_M
V_c	volume (geométrico) da coluna = $d_c^2 \pi L/4$
V_{ext}	volume do sistema externo à coluna
V_l	volume da fase móvel na coluna = $V_M - V_{ext}$
V_M	volume de retenção da fase móvel; volume da fase móvel eluído da coluna durante a passagem de um componente não retido pela fase estacionária = $t_M F$ (CL) = $t_M F_c$ (CG)
V_N	volume da retenção ajustado e corrigido = $V'_R j$
V_R	volume de retenção do soluto = $t_R F$(CL) = $t_R F_c$(CG)
V'_R	volume de retenção ajustado ($V'_R = V_R - V_M$)
V^o_R	volume de retenção corrigido (CG) = $V'_R j$
V_S	volume da fase estacionária (volume do líquido (CGL, CLL); volume de sítios ativos (CGS, CLS))
V_{tot}	volume total do sistema cromatográfico = $V_c + V_{ext}$
w_b	largura do pico na linha de base (entre tangentes)
w_h	largura do pico a meia-altura
W	massa
α	fator de separação (picos adjacentes) = $t'_{R2}/t'_{R1} = D_{m2}/D_{m1}$
α^*	separação (picos adjacentes) = t_{R2}/t_{R1}
β	razão de volumes das fases (V_M/V_S)
δ	parâmetro da força da fase móvel (CLL)
ε^O	parâmetro da força da fase móvel (CLS)
η	viscosidade
v	velocidade reduzida da fase móvel = $u\, d_p/D_M$
ρ	densidade

2.

SÍMBOLOS PARA CROMATOGRAFIA PLANAR

Símbolo	Definição
d_m	distância de migração da fase móvel
d_r	distância de migração do soluto
D_p	razão de distribuição = $R_f/(1-R_f) = d_r/(d_m-d_r)$
n_p	número de pratos teóricos = 16 d /w
R_f	fator de retenção = d_r/d_m
R_s	resolução = $2(d_{r1}-d_{r2})/(w_{s1}+w_{s2})$
ws	largura (longitudinal) da mancha
α_p	fator de separação = $d_{R1}/d_{R2} = R_{f1}/R_{f2}$

3.

SÍMBOLOS PARA CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

Símbolo	Definição
d_p	diâmetro das partículas da matriz (fase sólida)
F_c	vazão de fase móvel
h	altura equivalente a um prato teórico = L/n
h_r	altura reduzida = h/d_p
k'	fator de capacidade = $(V_R-V_o)/V_o$
K_o	coeficiente de distribuição $C_S/C_M = (V_R-V_o)/V_i$
L	comprimento da coluna
n	número de pratos teóricos = $16\,V_R^2/w_b^2$
N	Número de pratos efetivos = $16\,V_R'^2/w_b^2$
R	mobilidade relativa = V_o/V_r
R_s	resolução = $2(V_{R2}-V_{R1})/(w_{b1}+w_{b2})$
V_c	volume total da coluna = $V_o + V_i + V_g$
V_{ext}	volume da fase móvel externo a coluna; volume nas conecções, etc.
V_g	volume da matriz (fase sólida)
V_i	volume intrasticial; volume da fase móvel dentro dos poros da matriz
V_o	volume intersticial; volume da fase móvel na coluna fora dos poros da matriz; volume de retenção de um componente completamente excluído
V_R	volume de retenção do soluto
V_t	volume total da fase móvel = $V_o + V_i + V_{ext}$
w_b	largura do pico na linha de base (entre as tangentes)
β	razão de fases = V_o/V_i
OBS:	os parâmetros de retenção, etc., da cromatografia de exclusão são normalmente indicados pelos volumes correspondentes; porém poder-se-ia também utilizar os tempos, definidos: $V = tF_c$ ou $t = V/F_c$

4.

PROPRIEDADES DE FASES MÓVEIS USADAS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Fase móvel	ε^0	δ	η (mPa.s,25°)	I.R. (20°C)	p.e. (°C)	UV (nm)
perfluorohexano(FC78)	-0,25	6,0	0,39	1,2525	57	210
1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano (FC113)	0,00	7,1	0,68	1,3537	48	230
n-pentano	0,00	7,1	0,22	1,3575	36	200
n-hexano	0,01	7,3	0,29	1,3751	69	200
n-heptano	0,01	7,4	0,39	1,3878	98	200
2,2,4-trimetilpentano (isooctano)	0,01	7,0	0,49	1,3915	99	200
n-decano	0,04	-	0,92	1,4102	174	210
ciclohexano	0,04	8,2	0,90	1,4266	81	210
ciclopentano	0,05	8,1	0,42	1,4065	49	210
dissulfeto de carbono	0,15	10,0	0,35	1,6319	46	380
tetracloreto de carbono	0,18	8,6	0,91	1,5940	76	265
éter di-n-butil	0,25	-	0,64	1,3992	142	220
m-xileno	0,26	8,8	0,62	1,5372	139	290
1-clorobutano	0,26	8,4	0,42	1,4021	78	225
1-cloropentano	0,26	9,0	0,43	1,4127	108	225
éter di-n-propil	0,28	7,3	0,45	1,3809	91	220
éter diisopropil	0,28	7,3	0,38	1,3679	68	220
2-cloropropano	0,29	8,4	0,30	1,3777	36	225
tolueno	0,29	8,9	0,56	1,4961	111	285
1-cloropropano	0,30	8,3	0,35	1,3879	47	225
clorobenzeno	0,30	9,6	0,80	1,5241	132	280
benzeno	0,32	9,2	0,61	1,5011	80	280
bromoetano	0,35	8,8	0,38	1,4604	38	-
éter metil-t-butil	0,35	-	0,77	1,3690	55	210
sulfeto de dietila	0,38	8,9	0,45	1,4004	208	290
éter dietil	0,38	7,4	0,22	1,3526	34	220
clorofórmio	0,40	9,3	0,53	1,4459	62	245
diclorometano	0,42	9,7	0,43	1,4242	40	230

ε° = escala de polaridade segundo Snyder para cromatografia por adsorção (fase normal)
δ = escala de polaridade segundo Hildebrand para cromatografia por partição (fase normal)
η = viscosidade
I.R. = índice de refração
p.e. = ponto de ebulição
UV = comprimento de onda limite para uso com detector por obsorvância no ultravioleta

4.

PROPRIEDADES DE FASES MÓVEIS USADAS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Fase móvel	ε^0	δ	η (mPa.s,25°)	I.R. (20°C)	p.e. (°C)	UV (nm)
1,2-dicloroetano	0,44	9,7	0,78	1,4448	84	225
2-butanona (MEC)	0,51	9,3	0,38	1,3788	80	330
2-nitropropano	0,53	9,9	0,84	1,3944	120	380
trietilamina	0,54	7,5	0,38	1,4010	89	280
acetona	0,56	9,9	0,32	1,3588	56	330
1,4-dioxano	0,56	10,0	1,20	1,4224	101	210
tetrahidrofurano	0,57	9,1	0,46	1,4050	67	210
acetato de etila	0,58	9,6	0,44	1,3723	77	250
acetato de metila	0,60	9,2	0,36	1,3595	57	260
1-pentanol	0,61	9,8	4,10	1,4101	137	210
anilina	0,62	10,3	4,40	1,5863	184	325
dietilamina	0,63	8,0	0,37	1,3864	56	275
nitrometano	0,64	11,0	0,62	1,3817	101	380
acetonitrila	0,65	11,7	0,34	1,3442	82	190
1-aminopropano	-	8,7	0,35	1,3870	48	270
piridina	0,71	10,7	0,88	1,5095	116	305
tricloroetileno	-	9,2	0,57	1,4773	87	-
tetracloroetileno	-	9,3	0,90	1,5053	121	-
N,N-dimetil formamida	-	12,1	0,92	1,4305	150	270
2-metoxietanol	0,74	11,4	1,72	1,4024	125	220
carbonato de propileno	-	13,3	-	1,4189	24	-
dimetilsulfóxido	0,75	12,8	2,00	1,1014	189	265
2-propanol	0,82	11,5	2,30	1,3776	82	210
1-propanol	0,82	10,2	1,99	1,3850	97	240
etanol	0,88	12,7	1,08	1,3611	78	210
metanol	0,95	12,9	0,55	1,3288	65	205
1,2-etanodiol	1,11	14,6	17,20	1,4318	199	210
ácido acético	-	12,4	1,16	1,3716	118	250
água	-	23,4	0,89	1,3330	100	-

ε^0 = escala de polaridade segundo Snyder para cromatografia por adsorção (fase normal)

δ = escala de polaridade segundo Hildebrand para cromatografia por partição (fase normal)

η = viscosidade

I.R. = índice de refração

p.e. = ponto de ebulição

UV = comprimento de onda limite para uso com detector por obsorvância no ultravioleta

5.

COMPARAÇÃO DAS MALHAS DOS SÓLIDOS USADOS EM CROMATOGRAFIA

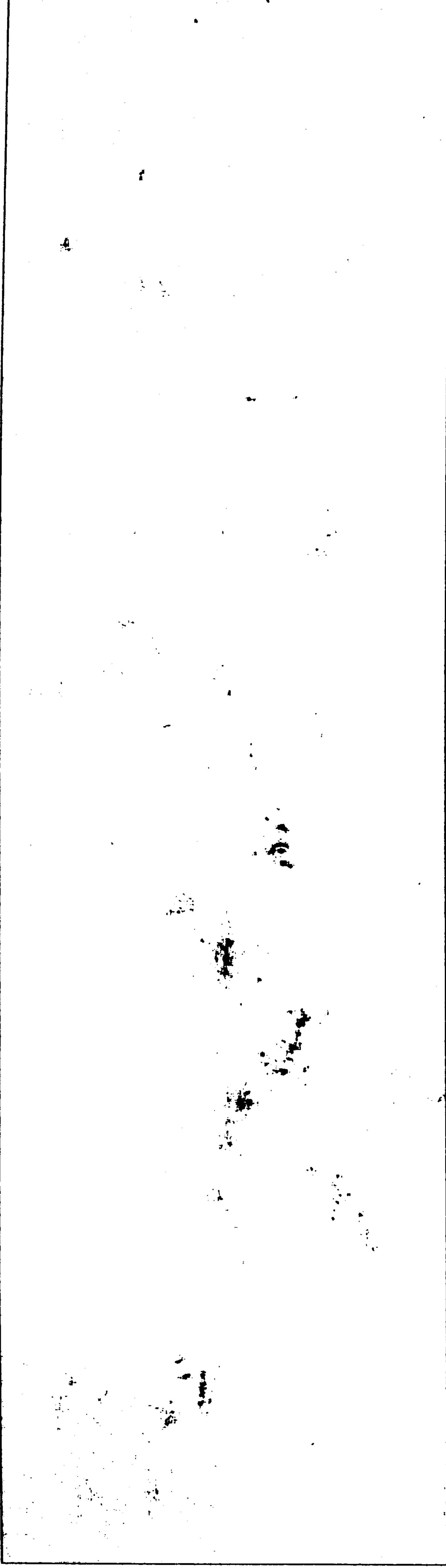
abertura na peneira (µm)	número da peneira* EUA[1] e Canadá[2]	Grã-Bretanha[3]	Japão[4]	RFA[5] e França[6]
2000	10	8	9,2	34
1680	12	10	10,5	--
1600	--	--	--	33
1410	14	--	12	--
1400	--	12	--	--
1250	--	--	--	32
1200	--	14	--	--
1190	16	--	14	--
1000	18	16	16	31
850	--	18	--	--
841	20	--	--	--
840	--	--	20	--
800	--	--	--	30
710	--	22	24	--
707	25	--	--	--
630	--	--	--	29
600	--	25	--	--
595	30	--	--	--
590	--	--	28	--
500	35	30	32	28
420	40	36	36	--
400	--	--	--	27
355	--	44	--	--
354	45	--	--	--
350	--	--	42	--
315	--	--	--	26
300	--	52	--	--
297	50	--	48	--
250	60	60	55	25
210	70	72	65	--
200	--	--	--	24
180	--	85	--	--
177	80	--	80	--
160	90	--	--	23
150	--	100	--	--
149	100	--	100	--
125	120	120	120	22
105	140	150	145	--
100	--	--	--	21
90	--	170	--	--
88	170	--	170	--
80	--	--	--	20
75	--	200	--	--
74	200	--	200	--
63	230	240	--	19
62	--	--	250	--
53	270	300	280	--
50	--	--	--	18
45	--	350	--	--
44	325	--	325	--
40	--	--	--	17
37	400	--	--	--

* os números da peneira especificam a faixa das malhas superiores e inferiores das partículas

1 ASTM E-11-61
2 8-GP-16
3 BS-410-62
4 JIS Z 8801
5 DIN 4188
6 AFNOR X-11-501

ÍNDICE

Outras Publicações:

Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos
Jaime Amaya Farfán, 1990, 134 pp.
Este livro faz uma apresentação breve e objetiva do que são as proteínas. Do que e como elas são formadas, quais as principais interações e reações a que estão sujeitas, e quais as possíveis aplicações da reatividade destes importantes componentes dos alimentos e de qualquer organismo vivo.

Introdução à análise e síntese de circuitos lógicos
Ivanil Bonatti e Marcos Madureira, 1990, 148 pp.
Este livro apresenta uma introdução à álgebra binária. Ele é dividido em três partes: Lógica Combinacional, Lógica Seqüencial e Simulação. É auto-suficiente como texto e previsto para um semestre letivo com 60 horas de aulas expositivas. É parte integrante deste livro um disquete contendo alguns programas de computador para simulação e síntese de circuitos lógicos.

Esta obra contém informações básicas, teóricas e práticas sobre os métodos cromatográficos: técnicas de larga aplicação em química e bioquímica na pesquisa e na indústria.
Ela se destina tanto aos cursos de graduação quanto aos de pós-graduação como livro introdutório às técnicas de separação cromatográfica. Pode, também, servir aos pesquisadores que precisam usar a cromatografia, sem necessitar, no entanto, de uma base teórica mais aprofundada.